

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003558

International filing date: 24 February 2005 (24.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-048767  
Filing date: 24 February 2004 (24.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 April 2005 (14.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

24.02.2005

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 2月24日  
Date of Application:

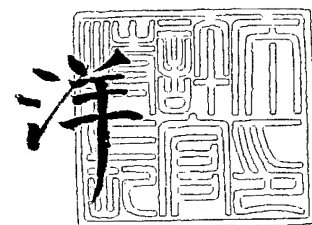
出願番号 特願2004-048767  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2004-048767]

出願人 株式会社インシリコサイエンス  
Applicant(s):

2005年 3月31日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3028445

【書類名】 特許願  
【整理番号】 PINA-16077  
【提出日】 平成16年 2月24日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G06F 17/60  
【発明者】  
    【住所又は居所】 千葉県浦安市美浜 1 - 7 - 1 0 0 2  
    【氏名】 梅山 秀明  
【発明者】  
    【住所又は居所】 静岡県御殿場市東田中 1 5 1 2 5 - D  
    【氏名】 渡邊 佳晃  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県志木市下宗岡 4 - 3 1 - 4 5  
    【氏名】 荒井 亮一  
【特許出願人】  
    【識別番号】 502433955  
    【氏名又は名称】 株式会社インシリコサイエンス  
【代理人】  
    【識別番号】 100089118  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 酒井 宏明  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100113103  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 香島 拓也  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 036711  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0302135

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

任意の単数を含む複数鎖のタンパク質立体構造が与えられた場合において、該当タンパク質の立体構造から誘導適合を反映したパラメータおよび構造変化した立体構造座標を例えば基準振動計算方法や分子動力学計算方法よりあらかじめ算出し、当該パラメータおよび構造変化した立体構造座標を用いて該当タンパク質と別の物質が結合した場合の相互作用関数を定義し、当該相互作用関数によって該当タンパク質と結合する物質をコンピュータプログラムにより評価し、選定する方法及びその装置。

## 【請求項 2】

請求項 1 によって記載された方法において、該当タンパク質に結合するリガンドを選択する際に (0) ~ (8) に示した一連の処理を全自動または手動的に行うことを特徴とするコンピュータプログラム及びその装置。

(0) 化合物データベースからリガンドを 1 つ選択する。該当タンパク質立体構造として、誘導適合を反映するパラメータを用いて動的挙動を考慮した複数の構造変化座標を用意し、ランダムに 1 つの構造を選択する。

(1) 重ね合わせを行う該当タンパク質中の空間点を指定する。

(2) (0) で選択したリガンド中の原子と (1) で指定した空間点とのペアを重複がないようにランダムに選択する。

(3) 以下のスコア  $Sscore(i, j)$  を計算する。

【数 1】

$$Sscore(i, j) = \sum_v \begin{cases} i \neq j \text{ のとき} \\ \alpha \times \left[ \exp\left\{-\left(d_{ij}^s - d_v^c\right)^2\right\} - \beta \right] / \frac{\left(d_{ij}^s + d_v^c\right)^2}{2} \\ i = j \text{ のとき} \\ \alpha \times (1 - \beta) \end{cases}$$

$d_{ij}^s$  は該当タンパク質中の  $i$  番目と  $j$  番目の空間点距離。 $d_{ij}^c$  は化合物中の  $i$  番目と  $j$  番目の原子間距離。 $\alpha$  は、該当タンパク質中の空間点群と化合物が完全に重なりあった場合に  $Sscore(i, j)$  を最大値とするための定数。 $\beta$  は重なりと定義できる限界値を与えるための定数。

(4) (3) のスコアが最大になるように調整する。

(5) (4) で重ねあわせたリガンドに対してタンパク質との相互作用エネルギーをコンフォメーションを微調整しながら最適化計算する。


(6) リガンドのコンフォメーションを大きく動かして、(2) から再スタートを行い、(5) までを繰り返して最適化を行う。

(7) (1) ~ (6) までの過程を (0) で用意した複数の構造変化座標に対して行い、最適なタンパク質とリガンドとの複合体座標、最適エネルギー「U最適」を算出する。

(8) (1) ~ (7) までの過程を (0) で用意した化合物データベース中の全てのリガンドに対して行い、化合物データベース中から該当タンパク質と結合する可能性のあるリガンドを選択する。

## 【請求項 3】





請求項 1～請求項 2 によって記載された方法において、タンパク質の誘導適合を反映するパラメータおよび構造変化した立体構造座標を分子動力学計算方法を用いて算出する場合、該当タンパク質の立体構造に際し、基準振動計算を行い、各アミノ酸のゆらぎの大きさを求め、そのゆらぎの大きさを拘束条件として、分子動力学計算を行うことで、タンパク質の立体構造をエネルギー最適構造よりおおきく離れないようにして分子動力学計算を行う方法及びその装置。

【請求項 4】

請求項 1～請求項 2 によって記載された方法において、リガンドとタンパク質との相互作用を評価する際の目的関数として、従来の相互作用エネルギー関数に、タンパク質の動的性質を表現する関数を弾性エネルギーとして加え、タンパク質の立体構造座標から相互作用エネルギーを高速に算出するとともに、タンパク質の動的挙動に関する物理化学的性質を明確に描写することを特徴とする手法及びその装置。

【請求項 5】

請求項 1～請求項 4 によって記載された方法において、タンパク質の動的性質を表現する関数として基準振動解析結果またはタンパク質の二次構造判定結果を用いることを特徴とした方法及びその装置。

【請求項 6】

請求項 1～請求項 5 によって記載された方法において、計算された該当タンパク質が代表的な複数の立体構造座標である場合や、該当タンパク質の立体構造が例えば核磁気共鳴スペクトルの解析結果のような複数の立体構造座標である場合についても、該当タンパク質と結合するリガンドの探索について、複数座標すべてを全自動的にかつ短時間で同等に評価することを可能とした方法及びその装置。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】タンパク質立体構造と誘導適合を利用したリガンド探索方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明はタンパク質の立体構造座標を用いたリガンド探索方法、詳しくはタンパク質立体構造座標が既知の場合、相互作用すると考えられるリガンドを予測する方法に関する。

更に、本発明は、この方法で得られるリガンド、前期方法に使用可能なデータベース、データベース構造、及びコンピューターソフトウェアプログラム、これを搭載したコンピュータやインターフェース等にも関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

酵素や受容体等の生体機能を維持するために必要なタンパク質には、基質特異性と呼ばれる性質があり、活性部位が基質分子構造の細部にわたり常に一致している Lock & Key 型と、基質が無いときには活性部位が不活性なランダムな状態にあり、基質が来るとこれを取り込むために活性部位が活性な状態に変化する Induced-Fit (誘導結合) 型がある。誘導適合型とは、リガンドと結合する際にリガンド結合部位の立体構造が変化しリガンドを取り込むことが可能になる受容体をいう。

## 【0003】

タンパク質の立体構造を用いたリガンド分子探索のための計算化学的手法としてはまず DOCK、Flex X、Ludi、GOLD、といった3次元化合物データベースサーチ (Virtual Screening) が知られている。これらは高速ドッキングスタディーとも呼ばれ大規模な化合物ライブラリサーチが可能である。しかし、本手法では評価に粗い近似を用いるため、結合配座や結合エネルギーの予測能は低い。さらにタンパク質とリガンドとの結合に大変重要な「誘導結合」に対応する計算式パラメータを充分に取り込んでいないので、たとえあったとしても、乱数を発生させ受容体の側鎖を動かす程度であり、計算結果の精度に充分なものとはいえない。

## 【0004】

タンパク質とリガンドとの結合に重要な「誘導結合」をシミュレーションする方法としては MD (分子動力学計算)、MM (分子力学計算) MC (モンテカルロ法) が知られている。これらの方法は比較的精度良く、結合配座や結合エネルギーの予測が可能である。ここで、分子動力学法 (MD) と呼ばれる手法に関しては、ある分子を構成する各原子において、古典力学に基づく運動方程式を逐次的に解くことにより、その分子の動的構造を計算する方法であり、タンパク質の動的挙動を高精度でシミュレーションすることが可能である。しかし、計算に時間を要するため、多数の分子を扱うことは困難であり必ずしも有用な手法とはなっていない。さらに、従来法では該当タンパク質に対して分子動力学計算を行うとタンパク質立体構造は X 線、NMR 等で解析された座標から大きくズレる。こうしたズレはタンパク質の動的挙動の物理化学的描写を含んでいるが NMR 等で示される動的挙動の実験的な結果と矛盾する挙動となる場合があり、必ずしも精度の高いシミュレーションとならないことが多い。

## 【0005】

このように従来の in silico screening 関連では、タンパク質とリガンドとの結合に大変重要な「誘導結合」に対応する計算式パラメータを充分に取り込んでいないので、計算結果の精度に充分なものとはいえない。

## 【0006】

一方、分子シミュレーションでは上記の誘導結合を表現し、解析することは可能であるが、高精度の結果を得るためには相当の時間を必要とする。多くの結果は、初期構造座標に依存してしまう。

## 【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本発明者等は、任意のタンパク質の立体構造が与えられたとき、該当タンパク質に結合するリガンドを探索する方法について検討をおこなった。現在流通している受容体・リガンド結合解析ソフトには、リガンドのフレキシビリティを考慮しているものは多くあるが、受容体側のフレキシビリティを考慮しているものはほとんどない。たとえあったとしても、乱数を発生させ受容体の側鎖を動かす程度であり、Lock & Key 型の受容体に対応しているものばかりであった。そこで、Induced-Fit 型の受容体を対象にした受容体・リガンド結合解析ソフト開発することにした。

#### 【0008】

本発明が解決しようとする課題は、農薬、医薬品等の開発に特に重要な鍵となる、該当タンパク質に結合するリガンドを探索する方法を精度よく、かつ従来法に比べてはるかに効率的に精度よく探索する方法を提供することである。また、リガンド分子の多様な改変や受容体等のタンパク質の改変を迅速かつ効率的に行う方法を提供することにもある。更に本発明により、リガンド・タンパク質間の相互作用様式を解明し、それ等相互作用の認識機構を明確化することで、疾病の原因を特定したり、それ等に関連する薬物の開発を促進すること等を目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本発明者等は、任意のタンパク質立体構造が与えられたとき該当タンパク質に結合するリガンドを探索する方法について検討を重ねた結果、下記〔1〕～〔6〕の方法およびそのためのコンピュータプログラムを見出し、或いは開発した。

#### 【0010】

ここで、分子動力学法（MD）と呼ばれる手法があり、これはある分子を構成する各原子において、古典力学に基づく運動方程式を逐次的に解くことにより、その分子の動的構造を計算する方法である。つまり、これはある分子を構成する各原子における古典力学を土台とした動的挙動を計算する方法である。従って、この手法をうまく取り込むことができれば、リガンドを取り込んでいない状態の Induced-Fit 型受容体を初期状態に選んでも受容体・リガンド結合を再現できると考えた。MD 計算は古典力学を土台にしているため、各原子にある程度の拘束をかける必要がある。そこで、まず初めに受容体の基準振動解析を行い受容体の主鎖二面角揺らぎを計算し、この主鎖二面角揺らぎに基づいて各原子に拘束をかけて MD を計算する手法を開発した。具体的には、基準振動解析計算をまず行い、定常状態の主鎖二面角の揺らぎを計算する。そして、その揺らぎを基にした拘束を各原子にかけながら分子動力学計算を行うことでより精度の良い受容体の動的構造を予測する。また、分子動力学計算より得た動的構造及び相互作用関数を用いることで、誘導適合型受容体にも応用できる受容体／リガンド結合を精度良く予測できる。本発明の方法は、より真に近い受容体／リガンド結合を予測する方法である。従って、本発明の方法は、医薬分子の設計に極めて有用である。

#### 【0011】

〔1〕 任意の単数を含む複数鎖のタンパク質立体構造が与えられた場合において、該当タンパク質の立体構造から誘導適合を反映したパラメータおよび構造変化した立体構造座標を例えば基準振動計算方法や分子動力学計算方法よりあらかじめ算出し、当該パラメータおよび構造変化した立体構造座標を用いて該当タンパク質と別の物質が結合した場合の相互作用関数を定義し、当該相互作用関数によって該当タンパク質と結合する物質をコンピュータプログラムにより評価し、選定する方法。

#### 【0012】

〔2〕 〔1〕 によって記載された方法において、該当タンパク質に結合するリガンドを選択する際に（0）～（8）に示した一連の処理を全自動または手動的に行うことを特徴とするコンピュータプログラム。

#### 【0013】

（0） 化合物データベースからリガンドを 1 つ選択する。該当タンパク質立体構造として、誘導適合を反映するパラメータを用いて動的挙動を考慮した複数の構造変化座標を用意

し、ランダムに1つの構造を選択する。

【0014】

(1) 重ね合わせを行う該当タンパク中の空間点を指定する。空間点は例えば以下のような方法で発生させる。

【0015】

1. ダミー原子の発生による空間点の発生

リガンドとタンパク質との相互作用における水素結合に着目し、タンパク質中の水素結合サイトを空間点として指定する。水素結合における重要事項は距離と角度である。つまり、角度を計算するためには、水素結合ドナー（以後、ドナー）に水素原子が必要になる。

【0016】

そこで、活性部位及びリガンドに水素原子が含まれていない場合、以下の規則によりダミー水素原子を発生させた。

【0017】

1)  $sp^2$ 軌道原子を中心とする正三角形にダミー原子を発生（図2）。すなわち、図2に示すように、 $sp^2$ 軌道原子の窒素原子（A）を中心とする正三角形の空いている位置にダミー水素原子（B）を発生させた。

【0018】

2)  $sp^3$ 軌道原子では、水素結合を形成する距離にある場合、水素原子を共有するように回転できると考え水素結合相互作用を計算するときには、距離のみを考慮することにした。このため、 $sp^3$ 軌道原子にはダミー原子を発生させない。

【0019】

金属及び水では、活性部位・リガンド結合の仲介役となり得るので、相互作用する位置に以下のようにダミー原子を発生させた。

【0020】

1) 鉄のような金属には、正八面体状にダミー原子を発生（図3）。すなわち、図3に示すように、亜鉛（A）を中心とする正八面体の空いている位置にダミー原子（B）を発生させた。

【0021】

2) 水は、正四面体状にダミー原子を発生。

【0022】

ただし、活性部位と相互作用している方向にはダミー原子を発生させないことにした。

【0023】

2. 構造活性相関情報を利用した空間点の発生

リガンドの構造活性相関（SAR）情報に着目し、以下の項目を入力情報にすることにした。

【0024】

(A) SARから得られた活性部位の原子（以後、「A原子」）。PDB形式に従う。

【0025】

(B) 「A原子」と相互作用するであろうリガンドの原子タイプ（以後、「Bタイプ」）。SYBYLのMOL2形式に従う。

【0026】

(C) 「A原子」と「Bタイプ」との相互作用の強さ（以後、「C強さ」）。

【0027】

(D) 「A原子」と「Bタイプ」との相互作用する距離（以後、「D距離」）（単位はÅ）。

【0028】

A)～D)をもとにタンパク質中の活性部位内におけるリガンドの初期座標を利用し、以下の規則により空間点を作成することにした。

【0029】

1) 「A原子」がドナーまたは金属及び水の場合 (SAR情報の活性部位側の指定が水素結合ドナー、金属原子の場合)、1. で発生させたダミー原子の方向に対して「A原子」から「D距離」の位置及びその周囲を初期座標に選んだ (図4、図5)。

【0030】

2) 「A原子」が  $sp^3$  軌道原子の場合 (SAR情報の活性部位側の指定が  $sp^3$  軌道原子の場合) には、「A原子」から「D距離」の周囲を初期座標に選んだ (図6)。

【0031】

3) 「A原子」が水素結合アクセプター (以後、アクセプター) の場合 (SAR情報の活性部位側の指定が水素結合アクセプターの場合)、「A原子」の結合延長上「D距離」の位置及びその周囲を初期座標に選んだ (図7)。

【0032】

4) その他の場合 (SAR情報の活性部位側の指定がその他の原子の場合) には、「A原子」を中心とする半径が「D距離」の球表面上の点を初期座標に選んだ (図8)。

【0033】

5) (1) ~ (4) とは、異なりリガンドの初期座標を直接指定することもできるようにした。

【0034】

(2) (0) で選択したリガンド中の原子と (1) で指定した空間点とのペアを重複がないようにランダムに選択する。

【0035】

(3) 以下のスコア  $Sscore(i, j)$  を計算する。

【数1】

$$Sscore(i, j) = \sum_j \begin{cases} i \neq j \text{ のとき} \\ \alpha \times \left[ \exp \left\{ - (d_{ij}^s - d_v^c)^2 \right\} - \beta \right] / \frac{(d_{ij}^s + d_v^c)^2}{2} \\ i = j \text{ のとき} \\ \alpha \times (1 - \beta) \end{cases}$$

$d_{ij}^s$  は該当タンパク質中の  $i$  番目と  $j$  番目の空間点距離。 $d_{ij}^c$  は化合物中の  $i$  番目と  $j$  番目の原子間距離。 $\alpha$  は、該当タンパク質中の空間点群と化合物が完全に重なりあった場合に  $Sscore(i, j)$  を最大値とするための定数。 $\beta$  は重なりと定義できる限界値を与えるための定数。

【0036】

$\alpha$  は 1.5、 $\beta$  は 0.8 とするのが好ましい。

【0037】

(4) (3) のスコアが最大になるように調整する。スコアを最大にする手法としては、例えば、シミュレーテッドアニーリング法が挙げられる。または、時間短縮には (2)、(3) を 10000 回繰り返し、 $Sscore(i, j)$  が最大になるペアを探し、そのペア情報をもとにリガンドを初期座標に重ね合わせる方法を適応することが好ましい。

【0038】

(5) (4) で重ねあわせたりガンドに対してタンパク質との相互作用エネルギーをコ

ンフォメーションを微調整しながら最適化計算する。リガンドのコンフォメーションの微調整は、(4)で算出されたりガンド座標を中心に並進、回転、シングルボンドまわりの角度をR SMDで0.3を越えない程度に座標変化させる。

#### 【0039】

微調整は例えばランダムサーチで最適化することが好ましい。ランダムサーチは以下の項目に従ってタンパク質の活性部位とリガンドとの微小変化を8000回行い、最適エネルギー「U最適」が最小になるようにする。

#### 【0040】

1] 回転可能な結合のうち最大5つ乱数で選び、結合ごとにランダムに±10.0°の範囲内で回転させリガンドのコンフォメーションを換える。この過程を3回に一度行う。

#### 【0041】

2] x、y、z軸方向それぞれにおいて、ランダムに±1.0Åの範囲内でリガンドの並進運動を行う。この過程を2回に一度行う。

#### 【0042】

3] 回転中心座標それぞれにおいて、ランダムに±1.0Åの範囲内で回転中心座標を移動させ、さらに3次元方向の角度それぞれに対して、ランダムに±5.0°の範囲内でリガンドの回転運動を行う。この過程を5回に一度行う。

#### 【0043】

(6) リガンドのコンフォメーションを大きく動かして、(2)から再スタートを行い、(5)までを繰り返して最適化を行う。コンフォメーション改変は、(3)で算出されたりガンド座標を中心に並進、回転、シングルボンドまわりの角度をR SMDで0.3以上になるよう座標変化させる。

#### 【0044】

リガンドのコンフォメーションを大きく動かした最適化は、例えば(5)で最適化したエネルギー「U最適」でのコンフォメーションに対して、回転可能な結合をランダムに5つ選び、原子タイプごとに決められた回転角度間隔に従ってランダムに回転させる。その後(2)、(3)の過程を、5000回繰り返し行う。

#### 【0045】

ただし、リガンドのコンフォメーションを変化させた後、リガンドの内部エネルギー「U内部」を計算しその値が500.0以上のときはその後の計算をスキップし、次のリガンドコンフォメーションを発生させるようにする。

#### 【0046】

(7) (1)～(6)までの過程を(0)で用意した複数の構造変化座標に対して行い、最適なタンパク質とリガンドとの複合体座標、最適エネルギー「U最適」を算出する。

#### 【0047】

(8) (1)～(7)までの過程を(0)で用意した化合物データベース中の全てのリガンドに対して行い、化合物データベース中から該当タンパク質と結合する可能性のあるリガンドを選択する。

#### 【0048】

[3] [1]～[2]によって記載された方法において、タンパク質の誘導適合を反映するパラメータおよび構造変化した立体構造座標を分子動力学計算方法を用いて算出する場合、該当タンパク質の立体構造に際し、基準振動計算を行い、各アミノ酸のゆらぎの大きさを求め、そのゆらぎの大きさを拘束条件として、分子動力学計算を行うことで、タンパク質の立体構造をエネルギー最適構造よりおおきく離れないようにして分子動力学計算を行う方法。

#### 【0049】

本手法による分子動力学計算は、例えば、基準振動計算より主鎖原子の2面角のゆらぎの値を算出し、該当のゆらぎ値を以下のように分子動力学計算における力の定数Kの部分に入れる。

$$E_{rot} = K_{rot} (\phi - \phi_0)^2$$

E r o t はタンパク質の立体構造中において主鎖原子の 2 面角のエネルギーのことを示す。

$\phi$  は主鎖原子の 2 面角。

$\phi 0$  は主鎖原子の 2 面角の標準値。

K r o t の値が大きい場合は  $\phi$  は  $\phi 0$  に拘束される。

$$E p o s = K p o s (r - r_0)^2$$

E p o s はタンパク質の立体構造中において主鎖原子の位置のエネルギーのことを示す。

r は主鎖原子の座標。

r 0 は主鎖原子の座標の標準値。

K p o s の値が大きい場合は r は r 0 に拘束される。

#### 【0050】

[4] [1] ~ [2] によって記載された方法において、リガンドとタンパク質との相互作用を評価する際の目的関数として、従来の相互作用エネルギー関数に、タンパク質の動的性質を表現する関数を弾性エネルギーとして加え、タンパク質の立体構造座標から相互作用エネルギーを高速に算出するとともに、タンパク質の動的挙動に関する物理化学的性質を明確に描写することを特徴とする手法。

#### 【0051】

弾性エネルギーとして、タンパク質の局所的な柔らかさを考慮し、以下の関数「U 衝突」として適応する。活性部位における動的挙動の少ない側鎖原子及び主鎖原子のみの i 番目の原子とリガンドの j 番目の原子との原子間距離 R が衝突距離「R 衝突 (i, j)」以内のとき、 $\psi (i, j)$  を計算するように定義した。

#### 【数 2】

$$U_{\text{衝突}} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \psi(i, j)$$

$$\psi(i, j) = K_{\text{衝突}} * (R_{\text{衝突}}(i, j) - R)^2$$

M は衝突を不許可とする活性部位の原子の数、N はリガンドの原子の数、「K 衝突」は 1000.0 であることが好ましい。「R 衝突 (i, j)」は活性部位の i 番目の原子とリガンドの j 番目の原子それぞれの V a n d e r W a a l s 半径の和とした。

#### 【0052】

ここで、活性部位の各原子に対し衝突を許す重み付け  $w(i)$  が定義された場合以下の式を用いる。ただし、 $w(i)$  は、0 ~ 1 の範囲の実数とする。

#### 【数 3】

$$U_{\text{衝突}} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \psi(i, j)$$

$$\psi(i, j) = w(i) * K_{\text{衝突}} * (R_{\text{衝突}}(i, j) - R)^2$$

M は活性部位の原子の数、N はリガンドの原子の数、「K 衝突」は 1000.0 であることが好ましい。「R 衝突 (i, j)」は活性部位の i 番目の原子とリガンドの j 番目の原子それぞれの V a n d e r W a a l s 半径の和とした。

#### 【0053】

また、弾性エネルギーとしては、以下の関数を用いて定義することも可能である。

$$E v = w(h a r d \quad s h a p e \quad r e g i o n), E = 0 (s o f t \quad s h a p e \quad r e g i o n)$$

hard shape regionとは、タンパク質の立体構造中、動的挙動の小さい部分であり、soft shape regionとは、動的挙動の大きい部分のことを指す。Wは定数で100であることが好ましい。

【0054】

[5] [1]~[4]によって記載された方法において、タンパク質の動的性質を表現する関数として基準振動解析結果またはタンパク質の二次構造判定結果を用いることを特徴とした方法。

【0055】

二次構造判定においては、タンパク質のヘリックス、シート部分は揺らぎは小さいと考え、それ以外は揺らぎは大きいと考え相互作用の評価関数、分子動力学計算の拘束条件に適應する。

【0056】

[6] [1]~[5]によって記載された方法において、計算された該当タンパク質が代表的な複数の立体構造座標である場合や、該当タンパク質の立体構造が例えば核磁気共鳴スペクトルの解析結果のような複数の立体構造座標である場合についても、該当タンパク質と結合するリガンドの探索について、複数座標すべてを全自動的にかつ短時間で同等に評価することを可能とした方法。

【発明の効果】

【0057】

本発明によれば、本発明はタンパク質の立体構造座標を用いたリガンド探索方法、詳しくはタンパク質立体構造座標が既知の場合、相互作用すると考えられるリガンドを予測する方法に関して、タンパク質とリガンドとの結合に大変重要であるタンパク質の動的挙動を反映したパラメータを取得し、かつタンパク質の動的挙動を反映したリガンドとの新規な相互作用評価関数を用いて、該当タンパク質の立体構造と結合する新規リガンドを予測を行うことができる。これにより従来法と比較して、より信頼性の高い、かつ医薬品設計等に適したタンパク質の立体構造を世界中で解析されている大量のゲノム配列に関しても対応するスピードで構築することができる。従来はin silico スクリーニングにおいては、タンパク質とリガンドとの相互作用に重要な誘導結合を充分に取り扱うことのできるアルゴリズムが見出されていなかった時点に対し、タンパク質とリガンドとの相互作用エネルギー関数に、基準振動計算結果、もしくは二次構造予測から得られるタンパク質の「ゆらぎ」を表すパラメータを簡易にとりこむ計算式を導入した。

【0058】

さらに、分子動力学シミュレーションにおいては、この方法により、該当タンパク質の動的挙動を反映したパラメータとリガンドとの相互作用評価関数に関して、該当タンパク質についての基準振動計算を行い、その結果を分子動力学計算に反映させることを特徴とする。従来はタンパク質の動的挙動のシミュレーションを行うためには、分子動力学計算を用いていたが、従来法で該当タンパク質に対して分子動力学計算を行うとタンパク質立体構造はX線、NMR等で解析された座標から大きくズレる。こうしたズレはタンパク質の動的挙動の物理化学的描写を含んでいるがNMR等で示される動的挙動の実験的な結果と矛盾する挙動となる場合があり、必ずしも精度の高いシミュレーションとならないことが多い。そこで、分子動力学計算を行う際には、タンパク質の立体構造をある程度固定しシミュレーションを行う必要があり、本手法では分子動力学計算におけるエネルギー関数中で主鎖原子の2面角に拘束をかける手法を開発した。さらに2面角の拘束条件としては、そのパラメータとして予め該当タンパク質の基準振動計算を行い、主鎖原子の2面角のゆらぎを算出し、そのゆらぎの大きさにより例えばゆらぎの大きい部分は拘束条件を緩め、ゆらぎの小さい部分は拘束条件を強めるパラメータとして用いることとした。こうした条件でタンパク質の分子動力学シミュレーションを行うことで、精度よく動的挙動を描写することができる。加えてこうして算出された分子シミュレーションからタンパク質の動的挙動を描写した座標を取得することができ、これを利用することでさまざまなリガンド



結合部位の形状を用いたリガンド探索を行うことができる。

【0059】

これらの結果、今までの *in silico* スクリーニングでは見出すことができなかった新規なリガンドを発見することを可能するとともに、今までは長時間を必要とする分子シミュレーションでしか解析できなかった「誘導結合」を含めたタンパク質-リガンドとの相互作用解析を短時間で行うことを可能にした。

【0060】

こうしたアルゴリズムは、既存ソフトウェアよりも誘導結合現象をより深く考慮した “*in silico screening*” に対応可能とし、誘導結合現象と疎水相互作用の正しい理解のもと単純化している。アルゴリズムは単純化されているので、自動化により多くのターゲットタンパク質を処理可能とする。その結果、例えば100万以上の化合物データベースから、新規で、もっともらしい化合物を探索することができるので実験では対応できない規模のデータベースからもっともらしい化合物を現実的な時間内に探索することが出来る。

【0061】

また、タンパク質-リガンドとの相互作用解析を短時間で行うことが可能になるので、例えば代謝、毒性の原因となる数多くのタンパク質と薬物との相互作用解析が可能となり、*in silico*での薬物の代謝、毒性予測を行うことができる。

【0062】

本発明において、リガンドとして取り扱うことのできる分子は使用するリガンドの種類や数を限定しないため、蛋白質、ペプチド、DNA、薬剤成分、金属、イオン、糖類、核酸成分、ホルモンを含む全ての物質を当該リガンドと見なすことができる。この方法によって、具体的に農薬、医薬品等の分子設計を行うことができる。

【0063】

リガンドとタンパク質との相互作用エネルギー評価関数には、従来ドッキング法では静電エネルギー項、*van der Waals*項、さらにはソフトドッキング法等に見られてる動的挙動を表現するための調整項が主に用いられているが、本手法においてはタンパク質とリガンドとの相互作用中にはソフトドッキング法等に見られてる動的挙動を表現するための調整項を用いる代わりに古典力学で用いられている弾性衝突の理論を適応し、タンパク質とリガンドとの相互作用に関して、その物理化学的性質をより明確にした。このことによりタンパク質の構造変化と相互作用との関係を得ることができ、リガンドの機能の理解を迅速かつ正確に行うための手助けとなる。

【0064】

尚、本発明で利用するタンパク質の立体構造は、その際X線結晶構造解析等により、タンパク質の立体構造として3次元座標が決定されたもの以外に、タンパク質の経験的なモデリング法、特にホモロジーモデリング法或いはスレッディング法を利用して作成した立体構造座標をも適応することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0065】

以下、本発明の実施の形態について説明する。好適かつ代表的な例について説明するのであり、本発明はこれに限定されるものではない。

【0066】

本明細書において幾つかの用語を使用するが、特に明記しない限り、次の意味を有する。

。


【0067】

「標的タンパク質」とは、立体構造の詳細がX線結晶解析やNMR解析、ホモロジーモデリング法により既に決定されており、リガンド探索の対象とするタンパク質を意味する。

。

【0068】

「原子座標」とは、三次元空間上で立体構造を記述するものである。それは空間上のあ



る点を原点とする互いに垂直な三方向の相対的な距離であり、タンパク質中に存在する水素原子を除く原子一つあたりに3個の数字からなるベクトル量である。

**【0069】**

図1は、本発明によるタンパク質立体構造と誘導適合を利用したリガンド探索方法の一例を示すフローチャートである。図1は、本発明によるタンパク質の立体構造予測を示すフローチャート。

**【0070】**

図1に示す通り、この方法においては、先ず、ステップ0において、リガンドのデータベースを用意する。リガンドのデータベースは分子力学法等に用いて3次元化することが望ましい。

**【0071】**

ステップ10において標的タンパク質の立体構造を選定し、座標を入手する。

**【0072】**

ステップ20において、標的タンパク質の基準振動計算を行い、主鎖原子の位置のゆらぎと2面角のゆらぎを求める。

**【0073】**

ステップ30において、ステップ20において求めた標的タンパク質のゆらぎを拘束条件として用いた分子動力学計算を行う。

**【0074】**

ステップ40において、標的タンパク質のリガンド結合部位に、リガンドを配置するための点群を指定する。

**【0075】**

ステップ50において、ステップ0で定められた一つのリガンドに対し、リガンドの各原子をステップ30で定められた点群に重ね合わせる。

**【0076】**

ステップ60において、ステップ50で定められた重ねあわせに対し、ステップ20およびステップ30で定められた計算結果によりタンパク質の動的挙動を表すパラメータを取得し、該当パラメータを用いてリガンドとタンパク質との相互作用エネルギーをリガンドコンフォメーションを微調整しながら計算する。コンフォメーションの微調整は、ステップ50で定められたリガンド座標を中心に並進、回転、シングルボンドまわりの角度をRMSDで0.3を越えない程度に座標変化させる。

**【0077】**

ステップ70において、ステップ50で定められたリガンドに対して、コンフォメーションを大きく動かして、ステップ50から再スタートを行い、ステップ70までを繰り返して最適化を行う。コンフォメーション改変は、ステップ50で算出されたリガンド座標を中心に並進、回転、シングルボンドまわりの角度をRMSDで0.3以上になるよう座標変化させる。

**【0078】**

ステップ80において、ステップ70まで得られた標的タンパク質とリガンドとの相互作用エネルギーを決定する。

**【0079】**

ステップ90において、ステップ40に戻り、ステップ0中の別のリガンドを選択し、ステップ80まで計算する。

**【0080】**

ステップ100において、ステップ0中でのリガンドに対し、ステップ90において定められた相互作用エネルギーを比較し、標的タンパク質に結合すると予想されるリガンドを選択する。

**【0081】**

本発明では、従来は標的タンパク質の立体構造が与えられた場合におけるリガンド探索が、タンパク質とリガンドとの相互作用にとって重要なタンパク質の動的な性質を反映さ

ることが困難であった時点に対し、ステップ20から90までを行うことで、タンパク質とリガンドとの相互作用において、タンパク質の動的性質に関する運動エネルギー部分を弾性率として扱い、リガンドの近接に伴うタンパク質の弾性的性質を取り込んだエネルギー評価関数（安定化に寄与する疑似弾性エネルギー）を用いることで、相互作用エネルギーを *van der Waals* 相互作用エネルギーと疑似弾性エネルギーとの和の形式とし、物理化学的現象をはっきりさせた評価関数を用いることが従来法と異なる点である。以下、各ステップについて更に詳細に説明する。

#### 【0082】

（ステップ0：リガンドデータベースの準備）

3次元座標を含むリガンドデータベースを用意する。リガンドデータベースとしては、例えば、ACD等のような市販化合物データベース、化合物を描いて収集した仮想化合物データを用いることができる。ガンドのデータベースは分子力学法等に用いて3次元化することが望ましい。

#### 【0083】

（ステップ10：標的タンパク質立体構造の選択と取得）

ステップ0で定められたリガンドデータベースから特定リガンドを探索するための標的タンパク質を選択し、3次元座標を入手する。3次元座標は、公共データベースであるPDBやホモロジーモデリング法等で作成した立体構造座標を用いることが望ましい。

#### 【0084】

（ステップ20：標的タンパク質の基準振動計算）

ステップ10で定められた参照タンパク質の動的挙動を表すパラメータを基準振動解析法による計算結果のデータベースもしくは二次構造判定計算をおこない取得する。まず、基準振動解析法によるタンパク質の動的挙動を表すパラメータ取得方法について下記に示す。

#### 【0085】

基準振動解析法とは、ポテンシャルエネルギーを変位の二次関数として近似し、運動方程式を厳密に解き、最適化構造の周りの微小な振動を解析する方法を意味する。解くべき運動方程式は下記式（1）または（2）である。

#### 【数4】

$$\left( \sum_j T_{ij} U_{jk} \right) \omega_k^2 = \sum_j V_{ij} U_{ik}$$

・・・（1）

#### 【数5】

$$TU\Lambda = VU$$

・・・（2）

ただし、

#### 【数6】

$$\Lambda_{ij} = \omega_i \delta_{ij}, U^T T U = (\delta_{ij})$$

#### 【0086】

ここで $\omega_k$ は固有値、 $U_{ik}$ は固有ベクトルであり、 $\delta_{ij}$ はクロネッカーのデルタである。 $T_{ij}$ と $V_{ij}$ はそれぞれ運動エネルギー $E_k$ とポテンシャルエネルギー $V$ に関係し、下記式（3）および（4）の通りである。

【数 7】

$$E_k = \frac{1}{2} \sum_{i,j} T_{ij} \dot{q}_i \dot{q}_j \quad \dots (3)$$

【数 8】

$$U_{vdw} = K_{vdw} \sum_{i,j(1,2)} \left\{ \left( \frac{3.8}{D_{i,j}} \right)^{12} - \left( \frac{3.8}{D_{i,j}} \right)^6 \right\} \quad \dots (4)$$

【0087】

ここで、 $q_i$  は振動の自由度に対応した座標、 $q_i^0$  は最適化座標、 $\dot{q}_i$  (式 (3) における「 $q_i$  ドット」を意味する) は  $q_i$  の時間による微分である。 $A_{jk}$  は集団運動  $Q_k$  と個々の原子運動  $q_j$  を結ぶ係数であり、下記式 (5) の通りである。

【数 9】

$$q_j = q_j^0 + \sum_k A_{jk} Q_k \quad \dots (5)$$

ただし、基準振動

【数 10】

$$Q_k = \alpha_k \cos(\omega_k t + \delta_k)$$

である。ここで、 $\alpha_k$  と  $\delta_k$  は初期条件で定められる。

【0088】

上記した基準振動解析法の詳細は「Wilson, E. B., Decius, J. C., and Cross, P. C. 1955. Molecular Vibration. McGraw-Hill.」に記載されている。

【0089】

参照タンパク質に対して、上記で得られた固有値、固有ベクトルを用いて、ある温度・ある固有値での各  $C\alpha$  原子の位置ゆらぎを計算し、このゆらぎの値を  $C\alpha$  が含まれるアミノ酸のゆらぎの値とする。目的タンパク質の各アミノ酸のゆらぎの値は、ステップ 50 におけるアライメントを利用して、目的配列と参照配列の比較から対応するアミノ酸残基ペアにおいて、目的タンパク質のゆらぎの値として参照タンパク質と同一のものを当てはめておく。ゆらぎの値を求められなかったものについては、予め設定しておいた値をあてはめる。こうして得た目的タンパク質の各アミノ酸のゆらぎの値を目的タンパク質の動的な挙動を表すパラメータとする。

【0090】

次に、二次構造判定計算によるタンパク質の動的挙動を表すパラメータ取得方法について下記に示す。

【0091】

二次構造判定はタンパク質の立体構造座標から計算される。ソフトウェアとしては、DSSP、STRIDE 等が好ましいが、基本的にはタンパク質の主鎖のねじれ角と水素結合パターンから判別される方法を用いる。

【0092】

ここで、「DSSP (Dictionary of protein seconda

ry structure of protein)」とは、PDB書式のファイルを入力ファイルとして、主鎖の水素結合パターンと、内部回転角等を解析し $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ シートとを判定するソフトウェアである。DSSPの詳細は、「Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers, 22:2577-2637」に記載されている。

#### 【0093】

「STRIDE (Protein secondary structure assignment from atomic coordinate)」とは、PDB書式のファイルを入力ファイルとして、主鎖の水素結合パターンと、内部回転角等を解析し $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ シートとを判定するソフトウェアである。STRIDEの詳細は、「Fishman, D & Argos, P. (1995) Knowledge-based secondary structure assignment. Proteins: structure, function and genetics, 23, 566-579」に記載されている。

#### 【0094】

参照タンパク質に対して、上記ソフトウェア等を用いて、二次構造計算を行い、各アミノ酸がとる $\alpha$ ヘリックス構造、 $\beta$ シート構造、ループ構造を判定する。目的タンパク質の各アミノ酸の二次構造は、ステップ50におけるアライメントを利用して、目的配列と参照配列の比較から対応するアミノ酸残基ペアにおいて、目的タンパク質の二次構造判定として参照タンパク質と同一のものを当てはめておく。二次構造判定を求められなかったものについては、予め設定しておいた結果をあてはめる。こうして得た目的タンパク質の各アミノ酸の二次構造判定結果を目的タンパク質の動的な挙動を表すパラメータとする。

#### 【0095】

上記の目的タンパク質の動的挙動を表すパラメータとしては、参照タンパク質の基準振動解析法より取得した結果を用いることが好ましく、該当計算結果は別途データベースとして保存されているものを使用する。二次構造判定計算結果は、好ましくは、基準振動解析が行われていない参照タンパク質を用いる際に基準振動解析計算の代用として使用する。

#### 【0096】

(ステップ30: 標的タンパク質の分子動力学計算 (拘束つき))

主鎖の位置拘束エネルギー「U位置」を導入し、初期の受容体骨格の変動を抑えながらAPRICOT [Yoneda S. & Umeyama H. (1992) Free energy perturbation calculations on multiple mutation bases J. Chem. Phys. 97, 6730-6736] を用いて最小化 (条件: 温度300 K、受容体の表面から水分子が最低2分子配置できる箱状水槽、力場: AMBER [S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, & P. Weiner (1984) A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins J. Am. Chem. Soc. 106, 765-784]) を行った。

$$U_{\text{位置}} = K_{\text{位置}} * R^2$$

ここで、「K位置」は300.0、Rは基準座標からのずれとした。

#### 【0097】

続いて、APRICOTに二面角拘束エネルギー「U二面角」を導入して、最小化した

受容体のMD計算（条件：温度300 K、受容体の表面から水分子が最低2分子配置できる箱状水槽、力場：AMBER）を行った。

$$U_{\text{二面角}} = K_{\text{二面角}} * (\theta - \theta_{\text{平衡}})^2$$

$\theta$  は二面角（単位 rad）。

#### 【0098】

「K二面角」には、最大値と最小値を指定することで、その範囲内で主鎖二面角揺らぎに対応するように各二面角に対して不均一な拘束がかかるようにした。以後、主鎖二面角を拘束しながら行うMDを二面角拘束MDと呼ぶことにする。

#### 【0099】

二面角拘束MD計算によりタンパク質構造座標を入手するには、受容体動的構造のクラスタリングを行う。

#### 【0100】

あらかじめ指定した活性部位に対して、MDの途中経過100 fsごとの受容体を重ね合わせた構造及び初期構造の活性部位を母集団とした。まず初めに、クラスタリングすることにより側鎖の動的情報が失われる可能性が高いことから、側鎖の二面角 $\chi$ において母集団の $\alpha\%$ が平均角度 $\pm 20.0^\circ$ の範囲で保存されている全側鎖二面角を収集した。ただし、主鎖の根元に近い方から $\chi$ が保存されていないと判定された場合はそれ以降の $\chi$ は保存されていないものとした。

#### 【0101】

次に、収集した保存側鎖二面角をすべて網羅している構造を母集団から抽出した。そして、抽出した構造の類似性を比較するために全原子rms（root mean square）が $\beta \text{ \AA}$ 以下の場合、同一構造と判断して一方を削除、最終的に選ばれた構造をもとに受容体動的構造クラスターを作成した。また、保存されていなかった二面角 $\chi$ を構成する原子では、変動する可能性が高いことから活性部位・リガンド結合計算において衝突しても良いことにした。ただし、 $\alpha$ 、 $\beta$ は定数。

#### 【0102】

（ステップ40：基準となる標的タンパク質上の空間点を選択する。）

ステップ30で作成した複数のタンパク質立体構造座標のうち1つをランダムに選択する。タンパク質座標中の空間点は例えば以下のような方法で発生させる。

#### 【0103】

##### 1. ダミー原子の発生による空間点の発生

リガンドとタンパク質との相互作用における水素結合に着目し、タンパク質中の水素結合サイトを空間点として指定する。水素結合における重要事項は距離と角度である。つまり、角度を計算するためには、水素結合ドナー（以後、ドナー）に水素原子が必要になる。そこで、活性部位及びリガンドに水素原子が含まれていない場合、以下の規則によりダミー水素原子を発生させた。

#### 【0104】

1)  $sp^2$ 軌道原子を中心とする正三角形にダミー原子を発生（図2）。

#### 【0105】

2)  $sp^3$ 軌道原子では、水素結合を形成する距離にある場合、水素原子を共有するように回転できると考え水素結合相互作用を計算するときには、距離のみを考慮することにした。このため、 $sp^3$ 軌道原子にはダミー原子を発生させない。

#### 【0106】

金属及び水では、活性部位・リガンド結合の仲介役となり得るので、相互作用する位置に以下のようにダミー原子を発生させた。

#### 【0107】

1) 鉄のような金属には、正八面体状にダミー原子を発生（図3）。

#### 【0108】

2) 水は、正四面体状にダミー原子を発生。

【0109】

ただし、活性部位と相互作用している方向にはダミー原子を発生させないことにした。

【0110】

2. 構造活性相関情報を利用した空間点の発生

リガンドの構造活性相関 (SAR) 情報に着目し、以下の項目を入力情報にすることにした。

【0111】

A) SAR から得られた活性部位の原子 (以後、「A 原子」)。PDB 形式に従う。

【0112】

B) 「A 原子」と相互作用するであろうリガンドの原子タイプ (以後、「B タイプ」)。SYBYL の MOL2 形式に従う。

【0113】

C) 「A 原子」と「B タイプ」との相互作用の強さ (以後、「C 強さ」)。

【0114】

D) 「A 原子」と「B タイプ」との相互作用する距離 (以後、「D 距離」) (単位は Å)。

【0115】

A) ~ D) をもとにタンパク質中の活性部位内におけるリガンドの初期座標を利用し、以下の規則により空間点を作成することにした。

【0116】

1) 「A 原子」がドナーまたは金属及び水の場合、1. で発生させたダミー原子の方向に対して「A 原子」から「D 距離」の位置及びその周囲を初期座標に選んだ (図 4、図 5)。

【0117】

2) 「A 原子」が  $sp^3$  軌道原子の場合には、「A 原子」から「D 距離」の周囲を初期座標に選んだ (図 6)。

【0118】

3) 「A 原子」が水素結合アクセプター (以後、アクセプター) の場合、「A 原子」の結合延長上「D 距離」の位置及びその周囲を初期座標に選んだ (図 7)。

【0119】

4) その他の場合には、「A 原子」を中心とする半径が「D 距離」の球表面上の点を初期座標に選んだ (図 8)。

【0120】

5) (1) ~ (4) とは、異なりリガンドの初期座標を直接指定することもできるようにした。

【0121】

(ステップ 50: ステップ 40 の点群にステップ 0 中でリガンド座標の一つを重ね合わせる。)

距離行列を用いたアライメント作成アルゴリズム (DALI) [Holm, L., & Sander, C. (1993) Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices J. Mol. Biol. 233, 123-138] を低分子用に改良した手法で初期座標とリガンドを重ね合わせた。

【0122】

(1) 1つの「B タイプ」には、リガンドの原子タイプが複数対応することが多い。そこで、乱数を用いて「B タイプ」とリガンドの原子タイプで同一視できるペアを作成した。ただし、ペアにおいてリガンドの原子タイプが重複しないようにした。

【0123】

(2) 「B タイプ」には、ステップ 40-2. により複数の初期座標が含まれているの

で、初期座標も乱数を用いて選択した。

【0124】

(3) 選択された初期座標とリガンドそれぞれの距離行列を作成し、 $Sscore(i, j)$  を計算する。

【数11】

$$Q_k = \alpha_k \cos(\omega_k t + \delta_k)$$

【数11】

$$Sscore(i, j) = \sum_y \begin{cases} i \neq j \text{ のとき} \\ \alpha \times \left[ \exp\{-(d_y^s - d_y^c)^2\} - \beta \right] / \frac{(d_y^s + d_y^c)^2}{2} \\ i = j \text{ のとき} \\ \alpha \times (1 - \beta) \end{cases}$$

$d_{ij}^s$  は該当タンパク質中の  $i$  番目と  $j$  番目の空間点距離。 $d_{ij}^c$  は化合物中の  $i$  番目と  $j$  番目の原子間距離。 $\alpha$  は、該当タンパク質中の空間点群と化合物が完全に重なりあった場合に  $Sscore(i, j)$  を最大値とするための定数。 $\beta$  は重なりと定義できる限界値を与えるための定数。

【0125】

$\alpha$  は 1.5、 $\beta$  は 0.8 とするのが好ましい。

【0126】

(4) (1) ~ (3) を 10000 回繰り返し、 $Sscore(i, j)$  が最大になるペアを探し、そのペア情報をもとにリガンドを初期座標に重ね合わせた。

【0127】

(ステップ60: 標的タンパク質との相互作用関数をリガンドのコンフォメーションを微調整しながら最適化する。)

ステップ50で重ねあわせたりガンドに対してタンパク質との相互作用エネルギーをコンフォメーションを微調整しながら最適化計算する。リガンドのコンフォメーションの微調整は、ステップ50で算出されたりガンド座標を中心に並進、回転、シングルボンドまわりの角度を RMSD で 0.3 を越えない程度に座標変化させる。

【0128】

微調整は例えばランダムサーチで最適化することが好ましい。ランダムサーチは以下の項目に従ってタンパク質の活性部位とリガンドとの微小変化を 8000 回行い、最適エネルギー「U最適」が最小になるようにする。

【0129】

1) 回転可能な結合のうち最大5つ乱数で選び、結合ごとにランダムに  $\pm 10.0^\circ$  の範囲内で回転させリガンドのコンフォメーションを換える。この過程を3回に一度行う。

2) x、y、z 軸方向それぞれにおいて、ランダムに  $\pm 1.0 \text{ \AA}$  の範囲内でリガンドの並進運動を行う。この過程を2回に一度行う。

【0130】

回転中心座標それぞれにおいて、ランダムに  $\pm 1.0 \text{ \AA}$  の範囲内で回転中心座標を移動



させ、さらに3次元方向の角度それぞれに対して、ランダムに $\pm 5.0^\circ$ の範囲内でリガンドの回転運動を行う。この過程を5回に一度行う。

### 【0131】

最適エネルギーは以下のように定義する。

$$U_{\text{最適}} = U_{\text{SAR}} + U_{\text{水素}} + U_{\text{疎水}} + U_{\text{スタッキング}} + U_{\text{衝突}} + U_{\text{内部}}$$

### 【0132】

ここで、原子のVan der Waals半径及び原子間相互作用距離はAMBER 99 [J. Wang, P. Cieplak & P. A. Kollam (2000) How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? J. Comput. Chem. 21, 1049-1074] およびMM3パラメータ [Ma B., Li J.-H., Allinger N. L. (2000) Molecular polarizabilities and induced dipole moments in molecular mechanics J. Comput. Chem. 21, 813-825] を参考にした。

### 【0133】

(a) SARに関するエネルギー関数

SAR情報に従う指標としてエネルギー $U_{\text{SAR}}$ を定義した。

### 【数12】

$$U_{\text{SAR}} = \sum_{i=1}^N \psi(i)$$

$$\psi(i) = K_{\text{SAR}}(i) * (R_{\text{SAR}}(i) - R)^2 - \delta$$

NはSAR情報の数、Rは「A原子」からリガンド側の相互作用原子までの距離、 $K_{\text{SAR}}(i)$ はi番目の「C強さ」、 $R_{\text{SAR}}(i)$ はi番目の「D距離」、 $\delta$ は20.0とした。

### 【0134】

(b) 水素結合に関するエネルギー関数

リガンドの1つのドナー（アクセプター）に対して1つだけ水素結合を形成すると考え、最短にある活性部位側のアクセプター（ドナー）を選び、水素を介した結合角 $\theta$ （図9。ただし、複数の水素原子が付加されているドナー原子の場合には、最小の水素結合角を $\theta$ と定義した。）を算出して、次の条件により分岐して $\psi(i)$ を計算するように定義した。図9において、Aはドナー、Bは水素、Cはアクセプター、 $\theta$ は水素結合角を示す。

### 【数13】

$$U_{\text{水素}} = \sum_{i=1}^N \psi(i)$$

(1) ドナー原子がsp<sup>3</sup>軌道原子、または水素結合角 $\theta$ が $\pm 30.0^\circ$ 以内のとき

## 【数 1 4】

$$\begin{aligned} \text{If } R > R_{\text{水素}}, \quad \phi(i) &= - \frac{K_{\text{水素}}(i)}{(R - R_{\text{水素}}(i) + 1.0)} \\ \text{Else,} \quad \phi(i) &= - \frac{K_{\text{水素}}(i)}{(R_{\text{水素}}(i) - R + 1.0)} \end{aligned}$$

(2) 水素結合角  $\theta$  が  $\pm 30.0^\circ$  以上のとき

## 【数 1 5】

$$\begin{aligned} \text{If } R > R_{\text{水素}}, \quad \phi(i) &= - \frac{K_{\text{水素}}(i)}{(R - R_{\text{水素}}(i) + 1.0) * \theta} \\ \text{Else,} \quad \phi(i) &= - \frac{K_{\text{水素}}(i)}{(R_{\text{水素}}(i) - R + 1.0) * \theta} \end{aligned}$$

N はリガンドのドナー+アクセプターの数、R は水素結合を形成する二原子間距離、「 $K_{\text{水素}}(i)$ 」及び「 $R_{\text{水素}}(i)$ 」は原子タイプごとに決めた水素結合の相互作用の強さ及び距離とした。

## 【0135】

(c) 疎水相互作用エネルギー

活性部位 (ALA、CYS、PHE、ILE、LEU、MET、PRO、VAL、TRP、TYR の側鎖。ただし、TYR の水酸基は除く) 及びリガンド (炭素原子) の疎水相互作用し得る原子に通し番号を付け、活性部位の  $i$  番目とリガンドの  $j$  番目との原子間距離  $R$  がカットオフ以内にあるとき  $\psi(i, j)$  を計算するように定義した。

## 【数 1 6】

$$U_{\text{疎水}} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \psi(i, j)$$

## 【数 1 7】

$$\begin{aligned} \text{If } R > R_{\text{疎水}}(i, j), \quad \psi(i, j) &= - \frac{K_{\text{疎水}}(i, j)}{(R - R_{\text{疎水}}(i, j) + 1.0)} \\ \text{Else.} \quad \psi(i, j) &= -K_{\text{疎水}}(i, j) \end{aligned}$$

M は活性部位の疎水相互作用し得る原子の数、N はリガンドの疎水相互作用し得る原子の数、「 $K_{\text{疎水}}(i, j)$ 」及び「 $R_{\text{疎水}}(i, j)$ 」は原子タイプごとに決めた疎水相互作用の強さ及び距離とした。また、カットオフは  $8.0 \text{ \AA}$  とした。

## 【0136】

(d) スタッキングエネルギー

活性部位及びリガンドの芳香環を形成する原子に通し番号を付け、活性部位においては芳香環の中心座標を算出した。活性部位の  $i$  番目とリガンドの  $j$  番目との原子間距離  $R$  がカットオフ以内にあるとき、 $i$  番目の原子が形成する芳香環の中心座標を  $i'$ 、 $j$  番目の最短距離あり共に同じ芳香環を形成するリガンドの原子を  $j'$  としたとき、 $\angle i i' j = \theta_{i' j}$ 、 $\angle i' i j = \theta_{ij}$ 、 $\angle i i' j' = \theta_{i' j'}$ 、 $\angle i' i j' = \theta_{ij'}$  を算出し (図 10)、 $\theta_{i' j}$  と  $\theta_{ij}$  とが  $90.0^\circ \pm 10.0^\circ$  のとき、「R 境界」と「 $\theta$  境界」を求め

次の条件により分岐して  $\phi(i, j)$  を計算するように定義した。図 10 において、 $i'$  は活性部位の芳香環中心、 $i$  は活性部位の芳香環原子、 $j, j'$  はリガンドの芳香環原子を示す。

【数 18】

$$U_{\text{スタッキング}} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \phi(i, j)$$

$$R_{\text{境界}} = 1.0 - (R_{\text{スタッキング}}(i, j) - R)^2$$

【数 19】

$$\Theta = \frac{\pi}{180.0} * (\theta - 90.0)^2$$

$$\theta_{\text{境界}} = |1.0 - \Theta|$$

If  $R_{\text{境界}} < 0.0$ ,

$$\phi(i, j) = -K_{\text{スタッキング}}(i, j) * R_{\text{境界}}$$

Else,

$$\phi(i, j) = -K_{\text{スタッキング}}(i, j) * \theta_{\text{境界}}$$

M は活性部位の芳香環を形成する原子の数、N はリガンドの芳香環を形成する原子の数、「 $K_{\text{スタッキング}}(i, j)$ 」及び「 $R_{\text{スタッキング}}(i, j)$ 」は原子タイプごとに決めたスタッキングの強さ及び距離とした。 $\pi$  は円周率、 $\theta$  は  $\theta_{i'j'}$  と  $\theta_{ij'}$  において  $\Theta$  が最小になる角度とした。また、カットオフは  $5.0 \text{ \AA}$  とした。

【0137】

(e) 分子間衝突 (弾性衝突エネルギー)

活性部位 (クラスタリングの際に定義した、保存されている側鎖原子及び主鎖原子のみ) の  $i$  番目の原子とリガンドの  $j$  番目の原子との原子間距離  $R$  が衝突距離「 $R_{\text{衝突}}(i, j)$ 」以内のとき、 $\phi(i, j)$  を計算するように定義した。

【数 20】

$$U_{\text{衝突}} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \phi(i, j)$$

$$\phi(i, j) = K_{\text{衝突}} * (R_{\text{衝突}}(i, j) - R)^2$$

M は衝突を不許可とする活性部位の原子の数、N はリガンドの原子の数、「 $K_{\text{衝突}}$ 」は  $1000.0$  とした。「 $R_{\text{衝突}}(i, j)$ 」は活性部位の  $i$  番目の原子とリガンドの  $j$  番目の原子それぞれの Van der Waals 半径の和とした。

【0138】

ここで、活性部位の各原子に対し衝突を許す重み付け  $w(i)$  が定義された場合以下の式を用いる。ただし、 $w(i)$  は、 $0 \sim 1$  の範囲の実数とする。

【数 21】

$$U_{\text{衝突}} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \phi(i, j)$$

$$\phi(i, j) = w(i) * K_{\text{衝突}} * (R_{\text{衝突}}(i, j) - R)^2$$

Mは活性部位の原子の数、Nはリガンドの原子の数、「K衝突」は1000.0であることが好ましい。「R衝突(i, j)」は活性部位のi番目の原子とリガンドのj番目の原子それぞれのVan der Waals半径の和とした。

#### 【0139】

(f) リガンド内部エネルギー

回転可能な結合を微小に変動させていくと、誤差で結合が切れる恐れがあるために「 $\psi$ 結合長(i)」を、また、リガンド内部で原子衝突が起こることも避けるために「 $\psi$ 衝突(i, j)」を計算するように定義した。

#### 【数22】

$$U_{\text{内部}} = \sum_{i=1}^L \psi_{\text{結合長}}(i, j) + \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N \psi_{\text{衝突}}(i, j)$$

$$\psi_{\text{結合長}}(i) = K_{\text{結合長}} * \{1000.0 * (R_{\text{結合長}}(i) - R_1)\}^2$$

$$\psi_{\text{衝突}}(i, j) = K_{\text{衝突}} * (R_{\text{衝突}} - R_2)^2$$

Lは回転可能な結合の数、Mはリガンドの原子数、Nはi番目の原子の非結合原子数、「K結合長」は100.0、「R結合長(i)」は初期構造の結合長、「K衝突」は150.0、「R衝突」は2.2 Å、またR<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>は二原子間距離とした。

#### 【0140】

(ステップ70: リガンドのコンフォメーションを大きく改変する。)

リガンドのコンフォメーションを大きく動かして、ステップ50から再スタートを行い、ステップ60までを繰り返して最適化を行う。コンフォメーション改変は、ステップ60で算出されたりガンド座標を中心に並進、回転、シングルボンドまわりの角度をRSM Dで0.3以上になるよう座標変化させる。

#### 【0141】

リガンドのコンフォメーションを大きく動かした最適化は、例えばステップ50で最適化したエネルギー「U最適」でのコンフォメーションに対して、回転可能な結合をランダムに5つ選び、原子タイプごとに決められた回転角度間隔に従ってランダムに回転させる。その後ステップ50、ステップ60の過程を、5000回繰り返し行う。ただし、リガンドのコンフォメーションを変化させた後、リガンドの内部エネルギー「U内部」を計算しその値が500.0以上のときはその後の計算をスキップし、次のリガンドコンフォメーションを発生させるようにする。

#### 【0142】

(ステップ80: 標的タンパク質とリガンドとの相互作用エネルギーの決定)

ステップ40から70まで「U最適」が最適値となる最適なタンパク質とリガンドとの複合体座標、最適エネルギー「U最適」を算出する。

#### 【0143】

(ステップ90: ステップ40に戻り、ステップ0中の別のリガンドを選択し、ステップ80まで計算する。)

ステップ40から90まではステップ0中の化合物データベース中のリガンド全てについて行われる。

#### 【0144】

(ステップ100: リガンドの選択)

ステップ90まで評価されたタンパク質とリガンドとの複合体座標、最適エネルギー「U最適」を基にステップ0中のデータベース中のリガンドから該当タンパク質と結合する可能性のある化合物を選ぶ。

#### 【0145】

以下に、本発明にかかる相互作用関数によって該当タンパク質と結合する物質をコンビ

ユータプログラムにより評価し、選定する方法及びその装置、該当タンパク質に結合するリガンドを選択する際に一連の処理を全自動または手動的に行うことを特徴とするコンピュータプログラム及びその装置、該当タンパク質の立体構造に際し、基準振動計算を行い、各アミノ酸のゆらぎの大きさを求め、そのゆらぎの大きさを拘束条件として、分子動力学計算を行うことで、タンパク質の立体構造をエネルギー最適構造よりおおきく離れないようにして分子動力学計算を行う方法及びその装置、タンパク質の動的挙動に関する物理化学的性質を明確に描写することを特徴とする手法及びその装置、タンパク質の動的性質を表現する関数として基準振動解析結果またはタンパク質の二次構造判定結果を用いることを特徴とした方法及びその装置、核磁気共鳴スペクトルの解析結果のような複数の立体構造座標である場合についても、該当タンパク質と結合するリガンドの探索について、複数座標すべてを全自動的にかつ短時間で同等に評価することを可能とした方法及びその装置を具体的な例を用いて詳細に説明する。

下記の実施例は、本発明の具体的な認識を得る一助と見るべきであり、本発明の範囲を何ら制限するものではない。

#### 【実施例 1】

##### 【0146】

(二面角拘束MDおよびクラスタリングにおけるパラメータ定数の決定)

基準振動解析により二面角のゆらぎ値が計算される。本発明においては、二面角のゆらぎ値を分子動力学計算における拘束条件として、

$$U_{\text{二面角}} = K_{\text{二面角}} * (\theta - \theta_{\text{平衡}})^2$$

$\theta$  は二面角 (単位 rad)。

中の「K二面角」に適應する。実際には「K二面角」の最大値と最小値を指定することで、その範囲内で主鎖二面角揺らぎに対応するように各二面角に対して不均一な拘束がかかるようにしている。本実施例では、「K二面角」の適切な最大値と最小値を決定することを目的とする。

##### 【0147】

さらに分子動力学計算後、構造変化した座標をクラスター解析し代表構造を選択する。その際、あらかじめ指定した活性部位に対して、MDの途中経過 100 f s e c ごとの受容体を重ね合わせた構造及び初期構造の活性部位を母集団とし、まず初めに、クラスタリングすることにより側鎖の動的情報が失われる可能性が高いことから、側鎖の二面角  $\chi$  において母集団の  $\alpha$  % が平均角度  $\pm 20.0^\circ$  の範囲で保存されている全側鎖二面角を収集した。ただし、主鎖の根元に近い方から  $\chi$  が保存されていないと判定された場合はそれ以降の  $\chi$  は保存されていないものとした。次に、収集した保存側鎖二面角をすべて網羅している構造を母集団から抽出した。そして、抽出した構造の類似性を比較するために全原子 rms (root mean square) が  $\beta$  Å 以下の場合、同一構造と判断して一方を削除、最終的に選ばれた構造をもとに受容体動的構造クラスターを作成した。また、保存されていなかった二面角  $\chi$  を構成する原子では、変動する可能性が高いことから活性部位・リガンド結合計算において衝突しても良いことにした。ここで  $\alpha$ 、 $\beta$  は定数となるが、本実施例では、適切な  $\alpha$ 、 $\beta$  を決定することを目的とする。

##### 【0148】

ここでは、リガンドと接触している活性部位において最も良い主鎖の動的構造を得ることが目的であるので、rms (root mean square) を計算するときは活性部位における主鎖原子 (N、C $\alpha$ 、C、O) の 4 原子のみが対象とした。

##### 【0149】

「K二面角」の最大値と最小値、クラスタリング定数  $\alpha$ 、 $\beta$  は NMR で解析される構造を再現できる値が適切であると考えられる。ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR、PDB code: 1LUD) は NMR で解析された構造である。そこでまず、NMR 構造のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR、PDB code: 1LUD) の MODEL 1 を初期構造

に基準振動解析を行い、ゆらぎ値を求めその後分子動力学計算をおこなった。また、1 LUD (MODEL 1) に含まれていたリガンドの各原子から半径 6 Å 以内に含まれる受容体残基を活性部位と定義した。分子動力学計算後は、受容体動的構造クラスタリングまで体残基を活性部位と定義した。分子動力学計算後は、受容体動的構造クラスタリングまで行なった。ただし、MD は 0 ~ 0.1 nsec までの結果を使用した。ここで、MD での拘束の最小値と最大値は 0 から 1000 まで (100 ごと)、クラスタリングにおいては、定数  $\alpha$  は 0 % から 90 % まで (10 % ごと)、定数  $\beta$  は NMR 構造平均値 rms を参考に、0.1 Å から 0.6 Å まで (0.1 Å ごと) の数値を網羅的に行い、1 LUD における NMR 構造すべてと比較することにより定数を決定することにした。

#### 【0150】

NMR 構造平均値は、受容体動的構造クラスタリングにおける定数  $\beta$  を決定するための参考として求めた。the Protein Data Bank (PDB) の NMR 構造のうち、受容体が単純タンパク質で、1 つの PDB ファイル内に記載されていた NMR 構造が 10 パターン以上あり、リガンドを含む 117 種類を対象に、活性部位の NMR 構造平均値 rms を求めることにした。

#### 【0151】

まず、MODEL 1 においてリガンドの各原子から半径 6 Å 以内に含まれる受容体残基を活性部位と定義した。MODEL 1 以外の構造において、MODEL 1 の活性部位との rms をそれぞれ求め、さらにその平均 rms を求めた。ここで、平均 rms が 1.0 Å 以上の場合は明らかな動的構造と見なせるので、そのような PDB ファイルを対象からはずした。これにより、対象となる PDB ファイルは 71 種類となった。71 種類の平均 rms をさらに平均化した値を NMR 構造平均値 rms とした。このようにして得られた NMR 構造平均値 rms は 0.62 となった。

#### 【0152】

「K 二面角」の適切な最大値と最小値、クラスタリングにおける定数  $\alpha$ 、 $\beta$  の決定に関しては、各パラメータ値と NMR 構造との比較を行った。

#### 【0153】

1 LUD には 24 種類の MODEL が含まれており、MODEL 1 を対象にしたので、これを除く 23 種類の MODEL の活性部位を正解構造とした。計算の結果出力された各受容体動的構造クラスターにおいて各正解構造と rms を計算しその中で最小の rms を「RMS 最小」として、各受容体動的構造クラスターから得られた「RMS 最小」の平均値をスコアとし、このスコアが最小となるパラメータを採用することにした。

#### 【0154】

図 11 に 1 LUD の MODEL 1 における基準振動解析結果を、図 12、図 13、図 15 ~ 18 にスコアとパラメータとの比較の結果を示す。

#### 【0155】

図 11 では、二面角  $\phi$  (橙色 A)、 $\psi$  (緑色 B) の揺らぎの大きさを示した。揺らぎが 0.0 に近いほど分子動力学法 (MD) 計算において二面角拘束が強くなる。また、STRIDE による二次構造判定で  $\alpha$ -ヘリックス (赤色 D)、 $\beta$ -シート (青色 D) を表示した。紫色 C は活性部位である。

#### 【0156】

図 12 において、この結果、定数  $\alpha$  は 70 % が良いという結果になったが、一般性を持たせるときに 70 % ではクラスタリングの精度が低下した場合もあったので、これよりマイルドにした 80 % を定数  $\alpha$  の値にした。

#### 【0157】

図 13 および図 15 ~ 18 において、クラスタリング定数を  $\alpha = 80.0\%$ 、 $\beta = 0.4$  Å に固定した。なお、黒色に近いほどスコアが小さい。

#### 【0158】

これらの結果より、スコアが小さくなる拘束条件としては図 14 の値が最適であると判断された。

#### 【0159】

これらの値の妥当性は、例えば、主鎖原子のみではなく、 $C\alpha$  原子、側鎖原子、全原子について調査しても図 14 のパラメータ値が最適であることが分かる。

### 【実施例 2】

#### 【0160】

(拘束パラメータ有無による分子動力学計算の相違)

本発明によって開発された拘束パラメータを適応した分子動力学計算を 2.0 nsec まで行い、活性部位の主鎖原子の動的挙動が拘束パラメータを適応しない場合と比較して構造がどの程度変化するかを調べた。

#### 【0161】

Case 1)

ジヒドロ葉酸還元酵素 (1LUD の MODEL 1) を対象に検証した。結果を図 19 ~ 図 21 に示す。基準振動計算結果は、実施例 1 で求めた値を適応した。

#### 【0162】

図 19 では、1LUD の PDB ファイル内に記載されている 24 種類の各モデル構造を MODEL 1 と活性部位の主鎖原子において rms を計算し、その平均 rms を点線で表示。二面角拘束があるとき (A) とないとき (B) において、活性部位の主鎖原子の初期構造からのずれを rms で表示。

#### 【0163】

図 20 に二面角拘束なしで MD を計算させた時の NMR 構造との比較を示す。図 20 において、白色は NMR 構造 (1lud) であり、黒色は MD 構造 (1lud) である。

#### 【0164】

表 1 に二面角拘束なしで MD を計算させた時の NMR 構造との比較を示す。

【表 1】

	活性部位	全体
$C\alpha$ のみ	3.8903	0.2919
主鎖	3.8642	0.3335
全体	4.447	0.1398 RMS

#### 【0165】

図 21 に二面角拘束ありで MD を計算させた時の NMR 構造との比較を示す。

#### 【0166】

表 2 に二面角拘束ありで MD を計算させた時の NMR 構造との比較を示す。

【表 2】

	活性部位	全体
$C\alpha$ のみ	0.6398	0.1194
主鎖	0.6933	0.1053
全体	1.2379	0.2157 RMS

#### 【0167】

Case 2)

ここでは、FMAS [Ogata K., Umeyama H. (2000) An automatic homology modeling method consisting of database searches and simulated annealing J. Mol. Graphics Mod. 18, 258-272] によりモデリングした構造 (モデル構造) と X 線構造を初期構造に選び、初期構造及び拘束の有無に依存することを検証した。また、リガンドの各原子から半径 10 Å 以内に含まれる受容体残基を活性部位と定義した。

#### 【0168】

cellular retinoic acid binding protein type II (CRABP-II) (PDB code: 1CBQ) の X 線構造 (立体

構造)を利用した。また、参照タンパク質にホモロジー32.1%のintestinal fatty acid binding protein (PDB code:1ICM)を選び、図22のアライメントでモデル構造を作成した。図23、図24、図25にX線とモデルの構造比較を示す。

#### 【0169】

図23には、1CBQの立体構造(X線構造(赤色A)およびモデル構造(青色B))を示す。図24には、図23の緑色Cで示される物質である6-(2,3,4,5,6,7-hexahydro-2,4,4-trimethyl-1-methyleneindene-2-yl)-3-methylhexa-2,4-dienoic acidの構造を示す。

#### 【0170】

図25には、1CBQのX線構造とモデル構造の相違をrmsで表示した。

#### 【0171】

図26は1CBQのX線構造の基準振動解析の結果を示す図であり、図27は1CBQのモデル構造の基準振動解析の結果を示す図である。図26および図27では、二面角 $\phi$ (橙色A)、 $\psi$ (緑色B)の揺らぎの大きさを示した。揺らぎが0.0に近いほど分子動力学法(MD)計算において二面角拘束が強くなる。また、STRIDEによる二次構造判定で $\alpha$ -ヘリックス(赤色D)、 $\beta$ -シート(青色D)を表示。紫色Cは活性部位。

#### 【0172】

図28には、1CBQのX線構造とモデル構造の分子動力学法(MD)計算の結果を示す。X線構造の活性部位の主鎖原子とのrmsを求めた。図28において、Aは初期構造がX線構造で二面角拘束なし、Bは初期構造がX線構造で二面角拘束あり、Cは初期構造がモデル構造で二面角拘束なし、Dは初期構造がモデル構造で二面角拘束あり、である。

#### 【0173】

##### Case3)

FlavodoxinのX線構造(PDB code:1J9G)を利用した。また、参照タンパク質にホモロジー29.2%のflavodoxin(PDB code:1AHN)を選び、図29のアライメントでモデル構造を作成した。図29には、1J9Gおよび1AHNのアライメントを示す。

#### 【0174】

図30には、1J9Gの立体構造(X線構造(赤色A)およびモデル構造(青色B))を示す。図31には、図30における緑色Cで示される物質であるflavin mononucleotideの構造を示す。

#### 【0175】

図32には、1J9GのX線構造とモデル構造の相違をrmsで表示する。

#### 【0176】

図33には1J9GのX線構造の基準振動解析の結果を、図34には1J9Gのモデル構造の基準振動解析の結果を示す。図33および図34において、二面角 $\phi$ (橙色A)、 $\psi$ (緑色B)の揺らぎの大きさを示した。揺らぎが0.0に近いほど分子動力学法(MD)計算において二面角拘束が強くなる。また、STRIDE[8]による二次構造判定で $\alpha$ -ヘリックス(赤色D)、 $\beta$ -シート(青色D)を表示。紫色Cは活性部位。

#### 【0177】

図35には、1J9GのX線構造とモデル構造の分子動力学法(MD)計算の結果を示す。X線構造の活性部位の主鎖原子とのrmsを求めた。Aは初期構造がX線構造で二面角拘束なし。Bは初期構造がX線構造で二面角拘束あり。Cは初期構造がモデル構造で二面角拘束なし。Dは初期構造がモデル構造で二面角拘束あり。

#### 【0178】

##### Case4)

Matrix metalloproteinase-8(MMP-8)のX線構造(PDB code:1MMB)を利用した。また、参照タンパク質にホモロジー55.0



%のMMP-3 (PDB code: 1B3D)を選び、図36のアライメントでモデル構造を作成した。図36には、1MMBおよび1B3D\_Aのアライメントを示す。

#### 【0179】

図37には、1MMBの立体構造(X線構造(赤色A)およびモデル構造(青色B))を示す。図38には、図37における緑色Cで示される物質であるbatimastatの構造を示す。

#### 【0180】

図39には、1MMBのX線構造とモデル構造の相違をrmsで表示する。

#### 【0181】

図40には1MMBのX線構造の基準振動解析の結果を、図41には1MMBのモデル構造の基準振動解析の結果を示す。図40および図41において、二面角 $\phi$ (橙色A)、 $\psi$ (緑色B)の揺らぎの大きさを示した。揺らぎが0.0に近いほど分子動力学法(MD)計算において二面角拘束が強くなる。また、STRIDE[8]による二次構造判定で $\alpha$ -ヘリックス(赤色D)、 $\beta$ -シート(青色D)を表示。紫色Cは活性部位。

#### 【0182】

図42には、1MMBのX線構造とモデル構造の分子動力学法(MD)計算の結果を示す。X線構造の活性部位の主鎖原子とのrmsを求めた。Aは初期構造がX線構造で二面角拘束なし。Bは初期構造がX線構造で二面角拘束あり。Cは初期構造がモデル構造で二面角拘束なし。Dは初期構造がモデル構造で二面角拘束あり。

#### 【0183】

Case 1) ~ Case 4) に示したとおり、拘束パラメータを適応した分子動力学計算結果は、拘束パラメータを適応しない場合と比較して、大きな構造変化は少ない。このことは古典力学を適応しているため大きな構造変化をってしまう分子動力学法において、拘束パラメータを適応することで大きな構造変化を合理的に拘束することができ、理想的な構造座標を得ることが可能であるということを示している。また、ホモロジーが高ければ、FMA Sの構造構築精度もあがる。すなわち、X線に近い構造を得られるので、アミノ酸の数個異なるミューテーションタンパク質にもこの手法は利用できる。

#### 【実施例3】

#### 【0184】

(タンパク質/リガンド複合体モデルの検証)

本発明により該当タンパク質に結合するリガンドの複合体立体構造が予測される。本実施例では、こうして予測された複合体立体構造座標の予測精度を検証する。検証には、複合体の立体構造が既知で、リガンドの有無もしくはリガンドの種類により活性部位の形が異なるInduced-Fit型のタンパク質を用いた。ここで、リガンドの各原子から半径10Å以内の残基をタンパク質の活性部位と定義した。また、X線構造またはNMR構造を初期構造に選んだMDでは、ほぼ一定の構造を保ち続けることが分かったのでMDを1.0nsecまで行うことにした。ただし、水素原子を除いて計算した。複合体モデル構築は、発明実施の形態に従って行った。


#### 【0185】

Case 1)

ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)である1BZFと1LUDとはホモロジーが100.0%でかつ結合しているリガンドが異なることにより活性部位の形が異なる。そこで、1BZF(MODEL18)を初期構造として選択し、リガンドとして2,4-diaminino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-pyrimidin-1-ium(図49)を用い、本発明によるプログラムによってタンパク質/リガンド複合体モデルを作成し、正解構造である1LUD(MODEL4)と比較することで検証した(図43)。

#### 【0186】

図43に、ジヒドロ葉酸還元酵素の立体構造を示す。図43では、1LUD(MODEL4)受容体(緑色A)とリガンド(赤色B)、1BZF(MODEL18)の受容体(



青色C)とリガンド(水色D)を示す。

**【0187】**

図44に1BZFの基準振動計算解析を示す。図44では、二面角 $\phi$ (橙色A)、 $\psi$ (緑色B)の揺らぎの大きさを示した。揺らぎが0.0に近いほど分子動力学法(MD)計算において二面角拘束が強くなる。また、STRIDEによる二次構造判定で $\alpha$ -ヘリックス(赤色D)、 $\beta$ -シート(青色D)を表示。紫色Cは活性部位。

**【0188】**

図45、図47に1BZFを用いた拘束二面角分子動力学の結果を示す。図45には、正解構造1LUD(MODEL4)の活性部位とのrmsを表示。Aは主鎖原子。Bは側鎖原子。Cは全原子。図47は、1BZF(MODEL18)における活性部位・リガンド結合解析であり、MD計算を0.1nsecまで行ったときの結合解析及び1.0nsecまで行ったとき、また、受容体動的構造クラスタリングを行うときの母集団を100fsecごと及び1000fsecごとで行ったときの結合解析。評価法は、正解構造との活性部位及びリガンドのrmsで行った。

**【0189】**

図46にリガンドドッキングにおける空間点指定のパラメータ値を示す。図46は、1LUD(MODEL4)より得られた構造活性相関情報。

**【0190】**

図48~図50にタンパク/リガンド複合体と正解構造との比較を示す。図48は、0~1.0nsecの範囲内で100fsecごとの母集団により作られたクラスターを用いて行った活性部位・リガンド結合。緑色Aは正解構造の1LUD(MODEL4)。青色Bは初期構造の1BZF(MODEL18)。そして赤色Cはリガンド結合における最適構造。要素色Dはリガンドの正解構造。水色Eは計算結果によるリガンド。リガンドのrmsは0.9614。図50のリガンドを結合させることにより活性部位の主鎖原子のrmsで0.2791の誘導が生じた。図49は黒色:正解(1ludのmodel4)、灰色:初期構造(1bzfのmodel18)、白色:最適構造。図50は、2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxy-benzyl)-pyrimidin-1-ium。1LUDのリガンド。

**【0191】****Case2)**

heat shock protein 90(HSP90)である1YERと1YETはホモロジーが100.0%でリガンド結合の有無により活性部位の形が異なる。そこで、リガンド結合していない1YERを初期構造に選び、リガンドとしてgeldanamycinを用い、正解構造である1YETと比較することで検証した(図51)。図51は、heat shock protein 90の立体構造である。1YETの受容体(緑色A)とリガンド(赤色B)。1YERの受容体(青色C)。

**【0192】**

図52に1YERの基準振動解析を示す。二面角 $\phi$ (橙色A)、 $\psi$ (緑色B)の揺らぎの大きさを示した。揺らぎが0.0に近いほど分子動力学法(MD)計算において二面角拘束が強くなる。また、STRIDEによる二次構造判定で $\alpha$ -ヘリックス(赤色D)、 $\beta$ -シート(青色D)を表示。紫色Cは活性部位。

**【0193】**

図53、図55に1YERを用いた拘束二面角分子動力学の結果を示す。正解構造1YETの活性部位とのrmsを表示。Aは主鎖原子。Bは側鎖原子。Cは全原子。図55は、1YERにおける活性部位・リガンド結合解析。MD計算を0.1nsecまで行ったときの結合解析及び1.0nsecまで行ったとき、また、受容体動的構造クラスタリングを行うときの母集団を100fsecごと及び1000fsecごとで行ったときの結合解析。評価法は、正解構造との活性部位及びリガンドのrmsで行った。

**【0194】**

図54にリガンドドッキングにおける空間点指定のパラメータ値を示す。図54は、1

YETより得られた構造活性相関情報。

#### 【0195】

図56および図57にタンパク／リガンド複合体と正解構造との比較を示す。図56および図57は1YER・リガンド結合。図56は、0～0.1nsecの範囲内で100fsecごとの母集団により作られたクラスターを用いて行った活性部位・リガンド結合。緑色Aは正解構造の1YET。青色Bは初期構造の1YER、そして赤色Cはリガンド結合における最適構造。要素色Dはリガンドの正解構造。水色Eは計算結果によるリガンド。リガンドのrmsは1.2081。図57のリガンドを結合させることにより活性部位の主鎖原子のrmsで0.1619の誘導が生じた。図57は、geldanamycin。1YETのリガンド。

#### 【0196】

Case3)

mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)である1A9Uと1OUKはホモロジー100.0%でかつ結合しているリガンドが異なることにより活性部位の形が異なる。そこで、1A9Uを初期構造に選び、リガンドとして1OUK中に含まれるリガンドを用い、正解構造である1OUKと比較することと検証した(図58)。図58はmitogen-activated protein kinaseの立体構造。図58において、1OUKの受容体(緑色A)とリガンド(赤色B)。1A9Uの受容体(青色C)とリガンド(水色D)。

#### 【0197】

図59に基準振動解析結果を示す。図59は1A9Uの基準振動解析。二面角 $\phi$ (橙色A)、 $\psi$ (緑色B)の揺らぎの大きさを示した。揺らぎが0.0に近いほど分子動力学法(MD)計算において二面角拘束が強くなる。また、STRIDEによる二次構造判定で $\alpha$ -ヘリックス(赤色D)、 $\beta$ -シート(青色D)を表示。紫色Cは活性部位。

#### 【0198】

図60、図62に1YERを用いた拘束二面角分子動力学の結果を示す。図60は1A9UのMD。図60に正解構造1OUKの活性部位とのrmsを表示。Aは主鎖原子。Bは側鎖原子。Cは全原子。図62は1A9Uにおける活性部位・リガンド結合解析。MD計算を0.1nsecまで行ったときの結合解析及び1.0nsecまで行ったとき、また、受容体動的構造クラスタリングを行うときの母集団を100fsecごと及び1000fsecごとで行ったときの結合解析。評価法は、正解構造との活性部位及びリガンドのrmsで行った。

#### 【0199】

図61にリガンドドッキングにおける空間点指定のパラメータ値を示す。図61は1OUKより得られた構造活性相関情報。

#### 【0200】

図63～図65にタンパク／リガンド複合体と正解構造との比較を示す。図63～図65は1A9U・リガンド結合。図63は、0～0.1nsecの範囲内で100fsecごとの母集団により作られたクラスターを用いて行った活性部位・リガンド結合。緑色Aは正解構造の1OUK。青色Bは初期構造の1A9U、そして赤色Cはリガンド結合における最適構造。要素色Dはリガンドの正解構造。水色Eは計算結果によるリガンド。リガンドのrmsは1.6112。図65のリガンドを結合させることにより活性部位の主鎖原子のrmsで0.1871の誘導が生じた。図64において、黒色：正解(1ouk)、灰色：初期構造(1a9u)、白色：最適構造。図65は1OUKのリガンド。4-[5-[2-(1-phenyl-ethylamino)-pyrimidin-4-yl]-1-methyl-4-(3-trifluoromethylphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-piperidine。

#### 【0201】

Case1)～Case3)に示す通り、本発明により作成されるタンパク質／リガンド複合体モデルは、誘導結合型のタンパク質／リガンド複合体の立体構造を精度よく予測

可能であることが分かる。

#### 【実施例 4】

##### 【0202】

(Fxaを用いた *in silico* Screeningへの応用例)

本発明により、セリンプロテアーゼの1種であるFxaの立体構造(図66)を用い、化合物データベースからFxaに結合する可能性のあるリガンドを探索した。立体構造には、1AIXを用い、リガンドデータベースとして、PDBデータベースより収集した3633種類のリガンドを用いた。発明実施の形態に従い、*in silico screening*を行った。その結果を図67に示す。

##### 【0203】

図67は、化合物データベース中のリガンドのうち、1AIXとの相互作用エネルギーの上位100個を示している。図67で、太字は1AIX中に含まれているリガンドで、斜線はセリンプロテアーゼ。PDB codeとは、リガンドが含まれているもとのPDB codeを示す。図67には、1AIXにもともと含まれているリガンドがランキング19位に入っている。

##### 【0204】

ランキング19位におけるタンパク質／リガンド複合体構造とを図68および図69に示す。図68において、白色は受容体、黒色は1AIXのリガンド。図69は1AIX中のリガンド。

##### 【0205】

図67中のランキング35位、38位、80位はすべてセリンプロテアーゼに結合するリガンドである。

##### 【0206】

これらの構造におけるタンパク質／リガンド複合体構造を図70および図71、図72および図73、図74および図75に示す。図70および図71はランキング35位におけるタンパク質／リガンド複合体構造。図70において、白色は受容体、黒色は1AUJのリガンド。図71は1AUJ中のリガンド。図72および図73はランキング38位におけるタンパク質／リガンド複合体構造。図72において、白色は受容体、黒色は正解(1FOR)のリガンド、RMSは1.500。図73は1FOR中のリガンド。図74および図75はランキング80位におけるタンパク質／リガンド複合体構造。図74において、白色は受容体、黒色は1K1Mのリガンド。図75は1K1M中のリガンド。

##### 【0207】

これらの結果から、本発明により、化合物データベースからもっともらしい化合物を選択することが可能であることが分かる。

#### 【実施例 5】

##### 【0208】

(異なる条件での *in silico* スクリーニング)

構造活性相関(SAR)の情報により順位が変動することを検証する。また、受容体を固定した場合の順位の変動も検証する。

##### 【0209】

ここでは、severe acute respiratory syndrome (SARS) のプロテアーゼを用いた *in silico screening* を行った。初期構造にはリガンドを含まない1UK3 (B鎖) を、またリガンドを含む1UK4 (B鎖) のリガンド結合様式を構造活性相関情報として利用した。活性部位は1UK4 (B鎖) のリガンドの各原子から半径10 Å以内に含まれる受容体残基部位。リガンドデータベースとして、PDBより収集した3633種類のリガンドを用いた。ただし、結合解析で利用する受容体動的構造クラスターには0~0.1 nsecの範囲内で100 fsecごとの母集団で作られたものを使用した。また、水素原子を除いて計算した。

##### 【0210】

図76はSARSプロテアーゼの立体構造。1UK4 (B鎖) の受容体(緑色A) とリ

ガンド (赤色 B)。1UK3 (B鎖) の受容体 (青色 C)。

#### 【0211】

図 77 に 1UK3 の基準振動解析の結果を示す。図 77 は 1UK3 (B鎖) の基準振動解析。二面角  $\phi$  (橙色 A)、 $\psi$  (緑色 B) の揺らぎの大きさを示した。揺らぎが 0.0 に近いほど分子動力学法 (MD) 計算において二面角拘束が強くなる。また、STRIDE による二次構造判定で  $\alpha$ -ヘリックス (赤色 D)、 $\beta$ -シート (青色 D) を表示。紫色 C は活性部位。

#### 【0212】

図 78 に 1UK3 の分子動力学計算の結果を示す。図 78 は 1UK3 (B鎖) の MD。1UK4 (B鎖) の活性部位との rms を表示。A は主鎖原子。B は側鎖原子。C は全原子。

#### 【0213】

Case 1) SAR4 カ所指定

図 79 に活性部位内での空間指定を示す。図 79 は 1UK4 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。

#### 【0214】

図 80 に in silico スクリーニングの結果を示す。図 80 は 1UK3 (B鎖) における in silico スクリーニングの結果。

#### 【0215】

図 81 に正解構造との比較を示す。図 81 は 1UK3 と 1UK4 との比較。順位 25。緑色 A は 1UK4 (B鎖)。青色 B は初期構造の 1UK3 (B鎖)、そして赤色 C はリガンド結合における最適構造。要素色 D は 1UK4 のペプチド性リガンド (ASN-SER-THR-LEU-GLN) の正解構造。E は計算結果によるリガンド。リガンドの rms は 2.5721。正解構造との活性部位の主鎖原子の rms は、初期構造では 1.0248、最適構造では 1.0792。

#### 【0216】

図 82 および図 83 に、in silico スクリーニングの順位 1 を示す。図 83 は 1QF4 のリガンド (C8-R)-hydantocidin 5'-phosphate。

#### 【0217】

Case 2) SAR3 カ所指定

図 84 に 1UK3 の活性部位内での空間指定を示す。図 84 は 1UK3 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。

#### 【0218】

図 85 には、1UK3 での最適構造と正解構造との比較を示す。図 85 は 1UK3 (B鎖) と 1UK4 (B鎖) との比較。順位 49。緑色 A は 1UK4 (B鎖)。青色 B は初期構造の 1UK3 (B鎖)、そして赤色 C はリガンド結合における最適構造。要素色 D は 1UK4 のペプチド性リガンド (ASN-SER-THR-LEU-GLN) の正解構造。水色 E は計算結果によるリガンド。リガンドの rms は 2.0057。正解構造との活性部位の主鎖原子の rms は、初期構造では 1.0248、最適構造では 1.0469。

#### 【0219】

図 86 には、SAR3 カ所指定での in silico スクリーニング結果を示す。図 86 は SAR3 カ所指定で実行した in silico スクリーニングの結果。

#### 【0220】

Case 3) SAR5 カ所指定

図 87 に 1UK3 の活性部位内での空間指定を示す。図 87 は 1UK3 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。

#### 【0221】

図 88 には SAR5 カ所指定での in silico スクリーニング結果を示す。図 88 は SAR5 カ所指定で実行したハイスループットスクリーニングの結果。

## 【0222】

図89には、1UK3での最適構造と正解構造との比較を示す。図89は1UK3 (B鎖) と1UK4 (B鎖) との比較。順位2。緑色Aは1UK4 (B鎖)。青色Bは初期構造の1UK3 (B鎖)、そして赤色Cはリガンド結合における最適構造。要素色Dは1UK4のペプチド性リガンド (ASN-SER-THR-LEU-GLN) の正解構造。水色Eは計算結果によるリガンド。リガンドのrmsは1.2578。正解構造との活性部位の主鎖原子のrmsは、初期構造では1.0248、最適構造では1.1620。

## 【0223】

Case 4) リガンド原子タイプ指定の変更

図90に1UK3の活性部位内での空間指定を示す。図90は1UK3 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。

## 【0224】

図91には、リガンド原子タイプ指定変更でのin silicoスクリーニング結果を示す。図91はリガンド原子タイプ指定変更で実行したハイスループットスクリーニングの結果。

## 【0225】

図92には、1UK3での最適構造と正解構造との比較を示す。図92は1UK3 (B鎖) と1UK4 (B鎖) との比較。順位774。緑色Aは1UK4 (B鎖)。青色Bは初期構造の1UK3 (B鎖)、そして赤色Cはリガンド結合における最適構造。要素色Dは1UK4のペプチド性リガンド (ASN-SER-THR-LEU-GLN) の正解構造。水色Eは計算結果によるリガンド。リガンドのrmsは2.5216。正解構造との活性部位の主鎖原子のrmsは、初期構造では1.0248、最適構造では1.0792。

## 【0226】

Case 5) 受容体固定

図93に活性部位内での空間指定を示す。図93は1UK4 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。

## 【0227】

図94に、受容体を固定したin silicoスクリーニングの結果を示す。図94は受容体を固定した状態で実行したハイスループットスクリーニングの結果。

## 【0228】

図95には、1UK3と1UK4を重ね合わせたリガンドと計算結果のリガンドとの比較を示す。順位39。灰色は1UK3の活性部位構造。黒色は1UK3と1UK4を重ね合わせたリガンド。白色は計算結果のリガンド。

## 【0229】

Case 1) ~ Case 4) を見ると、SARの指定が多いほど参考にしたリガンドの順位が良くなる。つまり、参考にできるリガンドの結合情報が信頼できる場合には、SARの情報を多くしたin silicoスクリーニングを行い、信頼性に欠ける場合には、SARの情報数を減らし、さらに、リガンド原子タイプ指定の幅を広げることで、様々なリガンドがランキング上位に分布する。そして、その分布情報をもとにSAR情報を作り変えてin silicoスクリーニングを実行するとより信頼性の持てる結果が出力されるはずである。

## 【0230】

Case 1) とCase 5) を見ると、受容体の動的構造の有無による順位変動を示している。これは、リガンドの動きのみの最適化に比べ、リガンド及び受容体それぞれが動く最適化の方が原子のぶつかりをさけることに優れている。従って、同じ位置に配置するための最適化エネルギーに差が生じる。

## 【実施例6】

## 【0231】

(二面角拘束分子動力学計算のパラメータに関するMDパラメータの分布)

FMN-binding proteinにおける二面角拘束MDパラメータの分布。

ここでは、1 L U D 以外の N M R 構造でも二面角拘束分子動力学計算及びクラスタリングのパラメータが同様の結果を生じるのかを検証する。そこで、F M N - b i n d i n g p r o t e i n の N M R 構造 ( P D B c o d e : 1 A X J ) の M O D E L 1 を初期構造に選んだ。評価法は、受容体動的構造クラスタリングのパラメーター ( $\alpha = 80.0\%$ 、 $\beta = 0.4 \text{ \AA}$ ) を固定したこと以外は実施例 1 に従った。

#### 【0232】

図 9 6 に 1 A X J における二面角拘束分子動力学計算のパラメータ決定のスコアの分布状況を示す。図 9 6 は 1 A X J における二面角拘束 MD パラメータの分布。A に近い部分ほどスコアで小さい。1 L U D の時と同様に二面角拘束の最大値 800、最小値 0 では良い結果を示す。

#### 【実施例 7】

#### 【0233】

(二面角拘束 MD)

ここでは、主鎖二面角拘束 MD で各原子の動的構造を検証する。また、時として基準振動解析が収束せず二面角揺らぎ情報が得られないことがある。そこで、図 1 3 により主鎖二面角に対して均一な拘束 (500) で MD を行ったときでも良い結果になっていることから、この場合における動的構造も検証する。実施例 1 に従い、拘束なし、二面角揺らぎを用いた拘束及び均一な拘束 (500) の条件のもと MD を行った。

#### 【0234】

図 9 7 ~ 図 1 0 8 に 1 L U D に対して行った分子動力学計算の各原子における動的挙動の結果を示す。図 9 7 ~ 図 1 0 8 は 1 L U D ( M O D E L 1 ) の MD。図 9 7 および図 9 8 は活性部位の主鎖原子、図 9 9 および図 1 0 0 は受容体の主鎖原子、図 1 0 1 および図 1 0 2 は活性部位の側鎖原子、図 1 0 3 および図 1 0 4 は受容体の側鎖原子、図 1 0 5 および図 1 0 6 は活性部位の全原子、図 1 0 7 および図 1 0 8 は受容体の全原子、における動的挙動の結果を示す図である。1 L U D の P D B ファイル内に記載されている 24 種類の各モデル構造を M O D E L 1 と活性部位の主鎖原子において r m s を計算し、その平均 r m s を点線で表示。二面角拘束があるとき (A) とないとき (B) 及び二面角拘束が 500 で一定 (C) において、活性部位の主鎖原子の初期構造からのずれを r m s で表示。

#### 【0235】

ここには、記載しないが 1 C B Q、1 J 9 G、1 M M B、1 B Z F ( M O D E L 1 8 )、1 Y E R、1 A 9 U 及び 1 U K 3 ( B 鎖) に関しても主鎖二面角揺らぎに基づく拘束 MD の結果を見ると、図 1 0 9 ~ 図 1 1 1 と同様に主鎖原子の抑制があると、拘束のない側鎖原子にも一定動きを示す。受容体の動きにおいて主鎖原子の動きの比重が大きいことが理解できる。

#### 【実施例 8】

#### 【0236】

(異なる条件での結合解析)

ここでは、二面角拘束 MD 及びクラスタリングのパラメータが異なっても誘導が生じることを検証する。拘束の最大値 100、最小値 0 及び受容体動的構造クラスタリング定数  $\alpha = 80.0\%$ 、 $\beta = 1.0 \text{ \AA}$  に設定して、その他は実施例 2 に従った。ただし、受容体動的構造クラスターには 0 ~ 0.1 n s e c の範囲内で 100 f s e c ごとの母集団で作られたものを使用した。また、活性部位の定義は、リガンドの各原子から半径 6  $\text{\AA}$  以内にある受容体残基とした。

#### 【0237】

図 1 0 9 ~ 図 1 1 1 には、異なる条件で受容体 / リガンド結合の結果を示す。

(i) 1 B Z F ( M O D E L 1 8 ) で、リガンド結合により活性部位の主鎖原子 r m s で 0.2686 の誘導が生じた (図 1 0 9)。活性部位全体の r m s では 0.1224 の誘導。リガンドの r m s は 0.8526。

(i i) 1 Y E R で、リガンド結合により活性部位の主鎖原子 r m s で 0.2376 の誘導が生じた (図 1 1 0)。活性部位全体の r m s では 0.0816 の誘導。リガンドの

$rms$  は 0.7246。

(i i i) 1A9U で、リガンド結合により活性部位の主鎖原子  $rms$  で 0.2150 の誘導が生じた (図 111)。活性部位全体の  $rms$  では 0.0464 の誘導。リガンドの  $rms$  は 0.9464。

#### 【0238】

ただし、緑色は正解構造、青色は初期構造、赤色は最適構造。要素色は正解リガンド、水色は最適リガンド。

#### 【0239】

図 109～図 111 で示すように、各条件が異なっている、与えられた条件の中で最適な結果を生じることができる。

#### 【実施例 9】

#### 【0240】

(正解構造を初期構造に選んだときの結合解析)

ここでは、DHFR の 1BZF 及び 1LUD はリガンドの結合様式が似ているので、構造活性相関情報を一部変更し 1BZF のリガンドの結合解析を行う。条件としては、初期構造に 1BZF (MODEL 18)、0～0.1 nsec までの母集団より作成したクラスターを使用した。

#### 【0241】

図 112 には、1BZF の活性部位内における空間指定を示す。図 112 は 1BZF 用に変更した構造活性相関情報。

#### 【0242】

図 113 および図 114 には、1BZF における受容体／リガンド結合の結果を示す。図 113 および図 114 は 1BZF (MODEL 18) のリガンド結合解析。

(i) 最適化したときの受容体には初期構造を選択し、リガンドの  $rms$  は 0.8884。(図 113)

(i i) trimetrexate。1BZF (MODEL 18) のリガンド。(図 114)

#### 【0243】

初期構造が元々 PDB に登録されていた構造、つまり最適構造であったため、計算結果でもそれが図 113 および図 114 のように再現できる。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0244】

以上、本発明の方法は、医薬品の分子設計等を中心に、受容体／リガンド結合の解析を行う分野 (医薬品設計) において、極めて有用であると考えられる。本発明は、産業上多くの分野、特に医薬品、食品、化粧品、医療、構造解析、機能解析等の分野で広く実施することができ、故に極めて有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0245】

【図 1】本発明によるタンパク質立体構造と誘導適合を利用したリガンド探索方法の一例を示すフローチャートである。

【図 2】 $sp^2$  軌道原子におけるダミー水素原子発生。

【図 3】金属原子におけるダミー原子発生。

【図 4】構造活性相関 (SAR) 情報をもとに活性部位内にリガンドを入れるための初期座標 (B) 発生。

【図 5】構造活性相関 (SAR) 情報をもとに活性部位内にリガンドを入れるための初期座標 (B) 発生。

【図 6】構造活性相関 (SAR) 情報をもとに活性部位内にリガンドを入れるための初期座標 (B) 発生。

【図 7】構造活性相関 (SAR) 情報をもとに活性部位内にリガンドを入れるための初期座標 (B) 発生。



【図 8】構造活性相関 (SAR) 情報をもとに活性部位内にリガンドを入れるための初期座標 (B) 発生。

【図 9】水素結合角の定義。

【図 10】スタッキングにおける角度の定義。

【図 11】1LUD (MODEL 1) の基準振動解析の結果。

【図 12】MD 及びクラスタリングのパラメータとスコア。

【図 13】クラスタリング定数を固定した時の MD での二面角拘束の最大値、最小値の分布。

【図 14】拘束パラメータ。

【図 15】クラスタリングのパラメータを固定した時の二面角拘束パラメータの分布

。

【図 16】クラスタリングのパラメータを固定した時の二面角拘束パラメータの分布

。

【図 17】クラスタリングのパラメータを固定した時の二面角拘束パラメータの分布

。

【図 18】クラスタリングのパラメータを固定した時の二面角拘束パラメータの分布

。

【図 19】1LUD (MODEL 1) の MD の結果。

【図 20】二面角拘束なしで MD を計算させた時の NMR 構造との比較。

【図 21】二面角拘束ありで MD を計算させた時の NMR 構造との比較。

【図 22】1CBQ のアライメント。

【図 23】1CBQ の立体構造。

【図 24】1CBQ の立体構造。

【図 25】1CBQ の X 線構造とモデル構造の相違を rms で表示。

【図 26】1CBQ の X 線構造とモデル構造の基準振動解析。

【図 27】1CBQ の X 線構造とモデル構造の基準振動解析。

【図 28】1CBQ の X 線構造とモデル構造の MD。

【図 29】1J9G のアライメント。

【図 30】1J9G の立体構造。

【図 31】1J9G の立体構造。

【図 32】1J9G の X 線構造とモデル構造の相違を rms で表示。

【図 33】1J9G の X 線構造とモデル構造の基準振動解析。

【図 34】1J9G の X 線構造とモデル構造の基準振動解析。

【図 35】1J9G の X 線構造とモデル構造の MD。

【図 36】1MMB のアライメント。

【図 37】1MMB の立体構造。

【図 38】1MMB の立体構造。

【図 39】1MMB の X 線構造とモデル構造の相違を rms で表示。

【図 40】1J9G の X 線構造とモデル構造の基準振動解析。

【図 41】1J9G の X 線構造とモデル構造の基準振動解析。

【図 42】1MMB の X 線構造とモデル構造の MD。

【図 43】ジヒドロ葉酸還元酵素の立体構造。

【図 44】1BZF (MODEL 18) の基準振動解析。

【図 45】1BZF (MODEL 18) の MD。

【図 46】1LUD (MODEL 4) より得られた構造活性相関情報。

【図 47】1BZF (MODEL 18) における活性部位・リガンド結合解析。

【図 48】1BZF (MODEL 4) ・リガンド結合。

【図 49】1BZF (MODEL 4) ・リガンド結合。

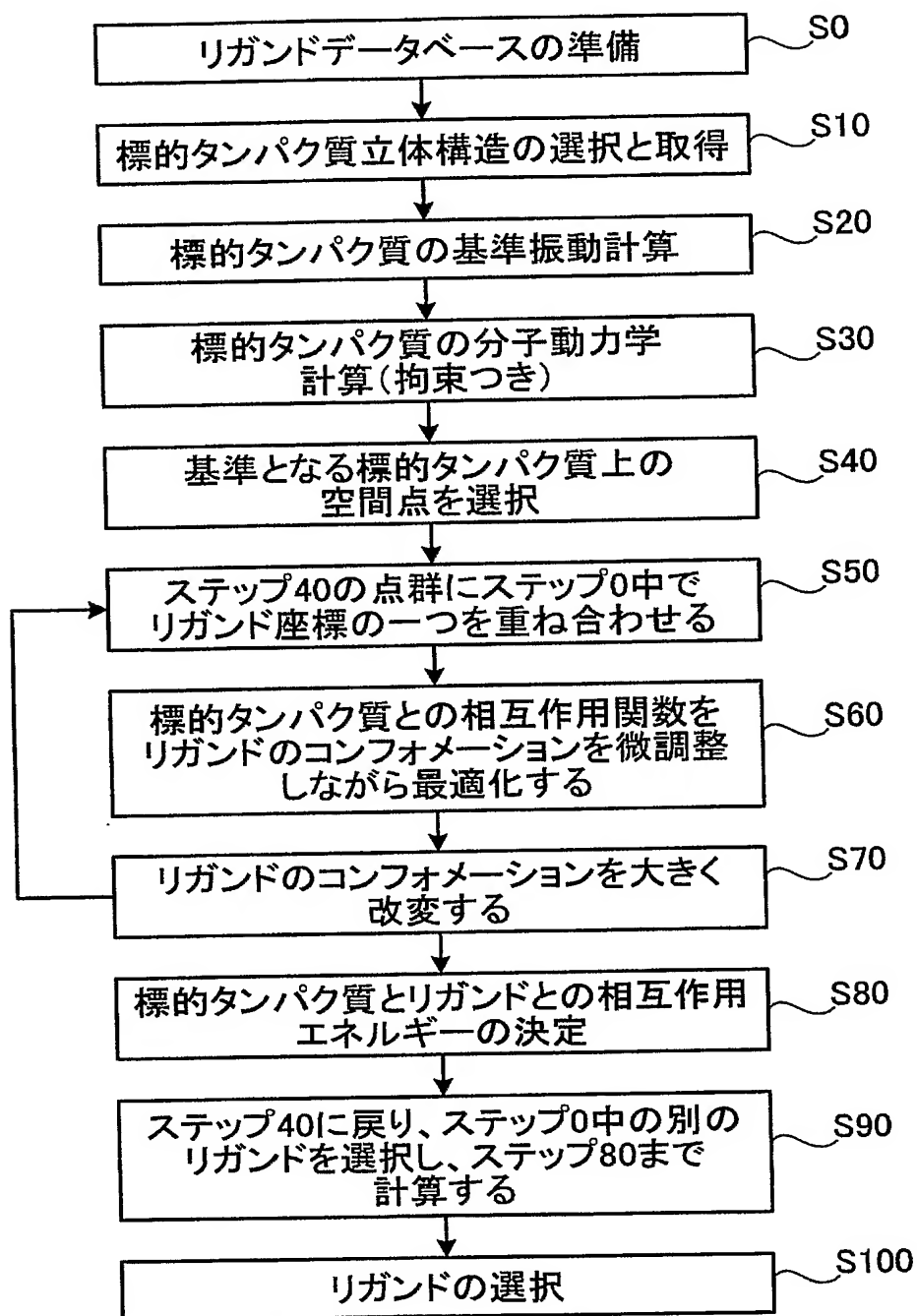
【図 50】1BZF (MODEL 4) ・リガンド結合。

【図 51】heat shock protein 90 の立体構造。

- 【図52】 1YERの基準振動解析。  
【図53】 1YERのMD。  
【図54】 1YETより得られた構造活性相関情報。  
【図55】 1YERにおける活性部位・リガンド結合解析。  
【図56】 1YER・リガンド結合。  
【図57】 1YER・リガンド結合。  
【図58】 mitogen-activated protein kinaseの  
立体構造。  
【図59】 1A9Uの基準振動解析。  
【図60】 1A9UのMD。  
【図61】 1OUKより得られた構造活性相関情報。  
【図62】 1A9Uにおける活性部位・リガンド結合解析。  
【図63】 1A9U・リガンド結合。  
【図64】 1A9U・リガンド結合。  
【図65】 1A9U・リガンド結合。  
【図66】 1AIXの立体構造。  
【図67】 in silico screeningの結果。  
【図68】 タンパク質／リガンド複合体構造。  
【図69】 タンパク質／リガンド複合体構造。  
【図70】 タンパク質／リガンド複合体構造。  
【図71】 タンパク質／リガンド複合体構造。  
【図72】 タンパク質／リガンド複合体構造。  
【図73】 タンパク質／リガンド複合体構造。  
【図74】 タンパク質／リガンド複合体構造。  
【図75】 タンパク質／リガンド複合体構造。  
【図76】 SARSプロテアーゼの立体構造。  
【図77】 1UK3 (B鎖) の基準振動解析。  
【図78】 1UK3 (B鎖) のMD。  
【図79】 1UK4 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。  
【図80】 1UK3 (B鎖) における in silicoスクリーニングの結果。  
【図81】 1UK3と1UK4との比較。  
【図82】 in silicoスクリーニングの順位1。  
【図83】 in silicoスクリーニングの順位1。  
【図84】 1UK3 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。  
【図85】 1UK3 (B鎖) と1UK4 (B鎖) との比較。  
【図86】 SAR3カ所指定で実行した in silicoスクリーニングの結果。  
【図87】 1UK3 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。  
【図88】 SAR5カ所指定で実行したハイスループットスクリーニングの結果。  
【図89】 1UK3 (B鎖) と1UK4 (B鎖) との比較。  
【図90】 1UK3 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。  
【図91】 リガンド原子タイプ指定変更で実行したハイスループットスクリーニング  
の結果。  
【図92】 1UK3 (B鎖) と1UK4 (B鎖) との比較。  
【図93】 1UK4 (B鎖) より得られた構造活性相関情報。  
【図94】 受容体を固定した状態で実行したハイスループットスクリーニングの結果  
。  
【図95】 1UK3と1UK4を重ね合わせたリガンドと計算結果のリガンドとの比  
較。  
【図96】 1AXJにおける二面角拘束MDパラメータの分布。  
【図97】 1LUD (MODEL1) のMD。

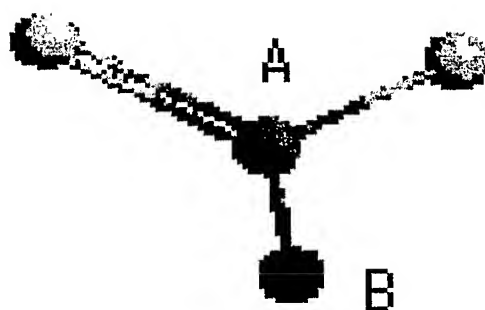
- 【図98】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図99】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図100】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図101】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図102】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図103】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図104】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図105】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図106】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図107】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図108】 1LUD (MODEL 1) のMD。
- 【図109】 異なる条件で受容体／リガンドの結合結果。
- 【図110】 異なる条件で受容体／リガンドの結合結果。
- 【図111】 異なる条件で受容体／リガンドの結合結果。
- 【図112】 1BZF用に変更した構造活性相関情報。
- 【図113】 1BZF (MODEL 18) のリガンド結合解析。
- 【図114】 1BZF (MODEL 18) のリガンド結合解析。

【書類名】 図面  
【図 1】

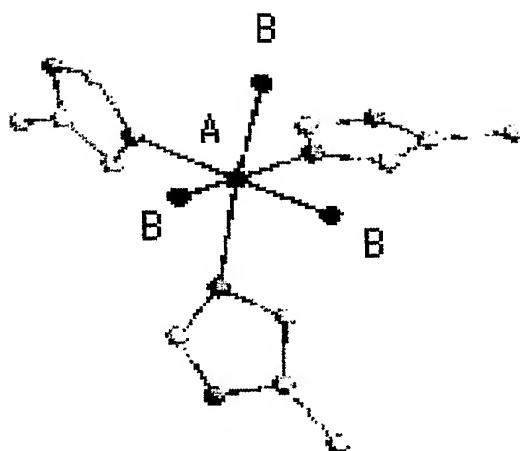




【図 2】

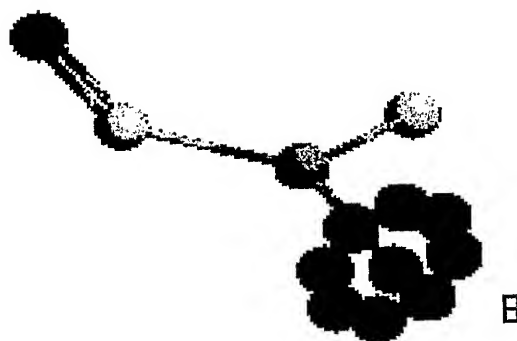


【図 3】

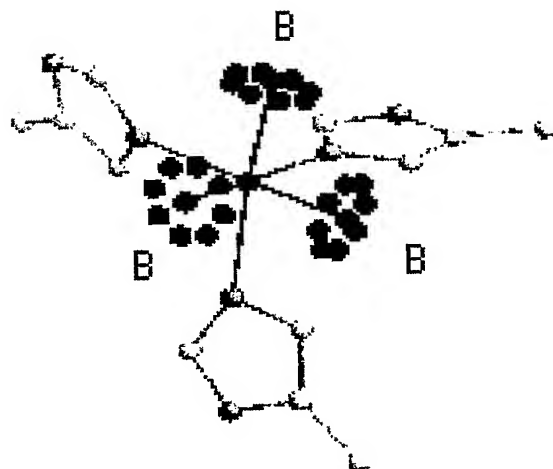




【図 4】

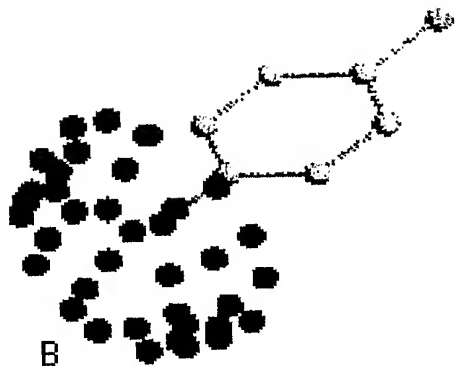


【図 5】

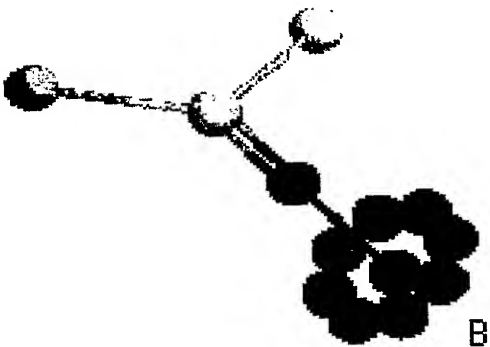




【図 6】

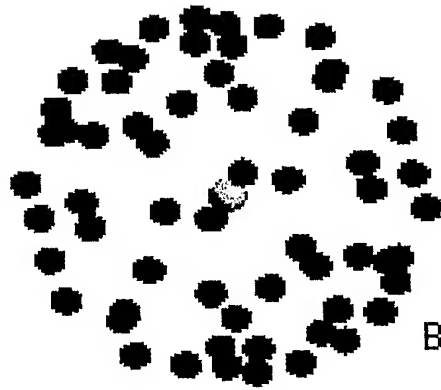


【図 7】

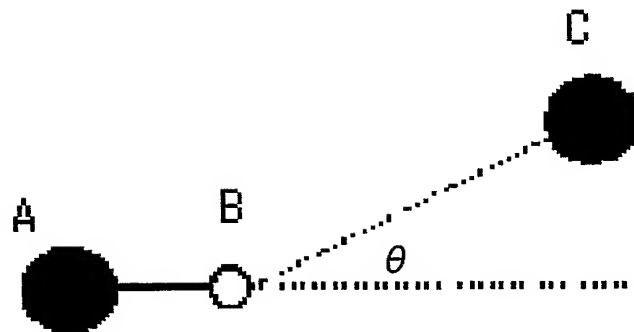




【図 8】

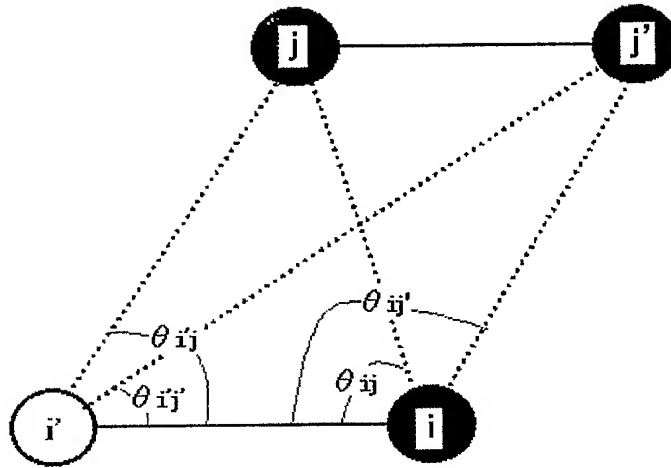


【図 9】

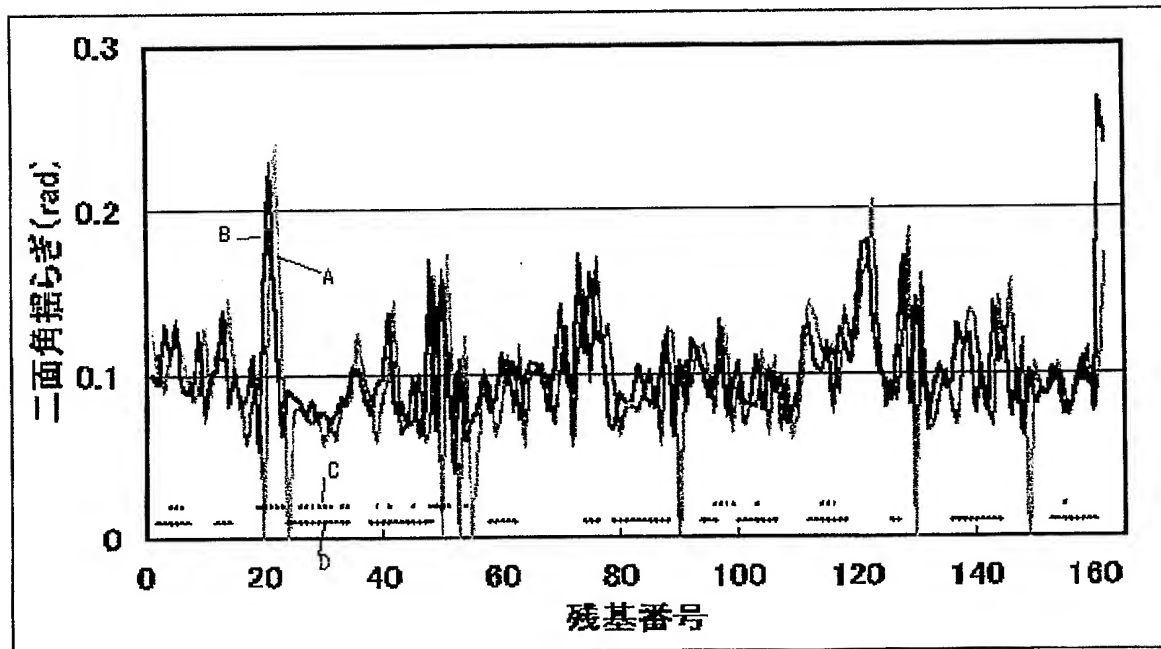




【図 10】



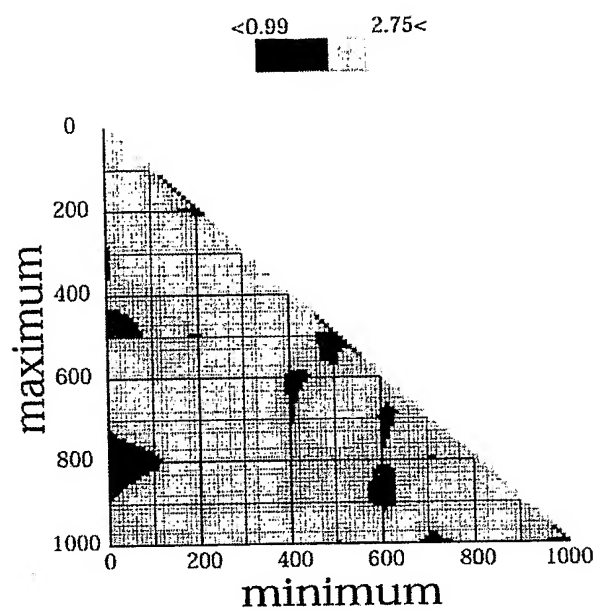
【図 11】



【図 12】

順位	最小値	最大値	$\alpha$ (%)	$\beta$ (Å)	クラスター数	スコア
1	0	800	70	0.4	57	0.9054
2	0	800	70	0.1	62	0.9097
3	0	800	70	0.2	62	0.9097
4	0	800	70	0.3	62	0.9097
5	0	800	80	0.1	81	0.9102
6	0	800	80	0.2	81	0.9102
7	0	800	70	0.5	52	0.9103
8	0	800	80	0.4	73	0.9106
9	0	800	80	0.3	80	0.9116
10	0	800	80	0.5	67	0.9151
11	0	800	70	0.6	46	0.9156
12	0	800	90	0.5	240	0.9183
13	0	800	90	0.6	174	0.9194
14	0	800	60	0.6	13	0.9211
15	0	800	90	0.4	297	0.9225
16	0	800	80	0.6	58	0.9261
17	0	800	90	0.1	425	0.9286
18	0	800	90	0.2	425	0.9286
19	0	800	90	0.3	420	0.9296
20	0	800	60	0.1	16	0.9354
21	0	800	60	0.2	16	0.9354
22	0	800	60	0.3	16	0.9354
23	0	800	60	0.4	16	0.9354
24	0	800	60	0.5	15	0.9451
25	600	900	60	0.1	28	0.9469
26	600	900	60	0.2	28	0.9469
27	600	900	60	0.3	28	0.9469
28	600	900	60	0.4	28	0.9469
29	600	900	60	0.5	27	0.9518
30	600	900	60	0.6	27	0.9518

【図 13】

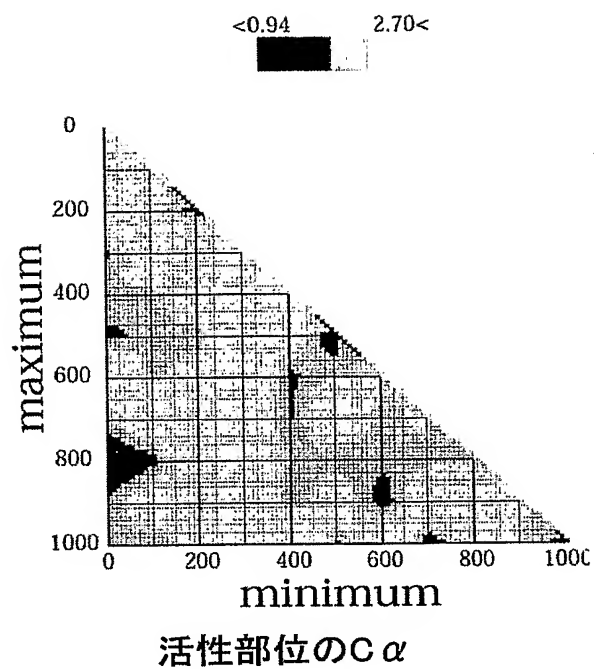


【図 14】

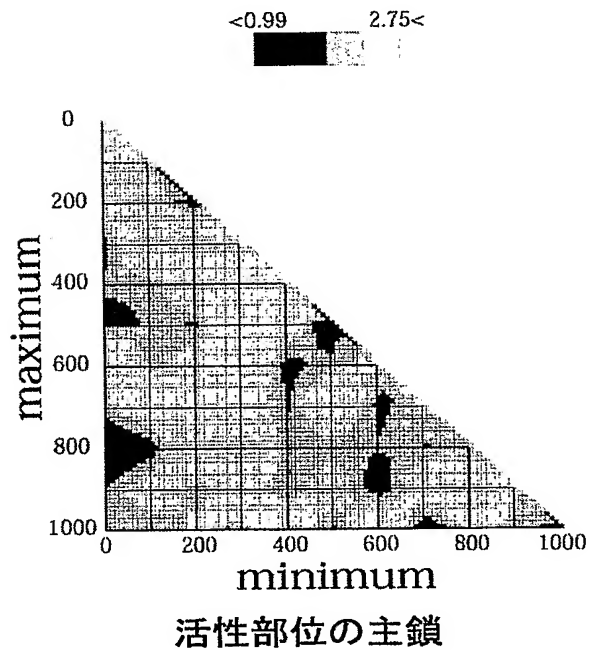
MD拘束の最小値	0.00
MD拘束の最大値	800.00
クラスタリングの定数 $\alpha$ (%)	80.00
クラスタリングの定数 $\beta$ (Å)	0.40



【図 15】

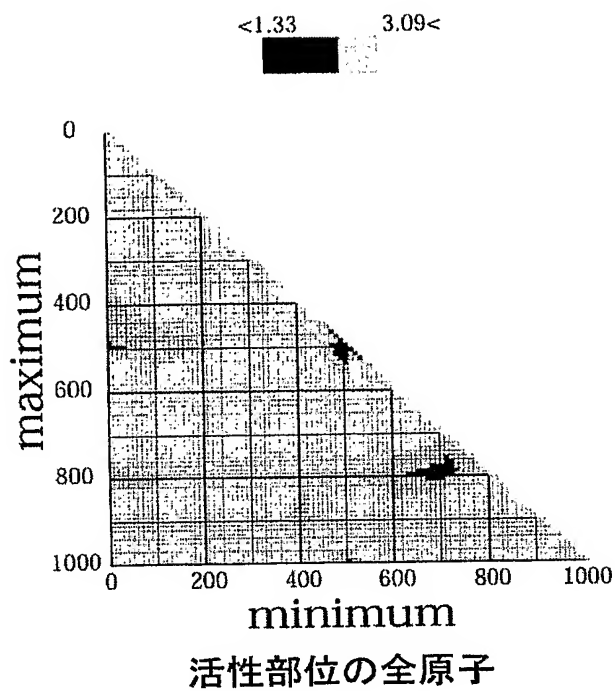


【図 16】

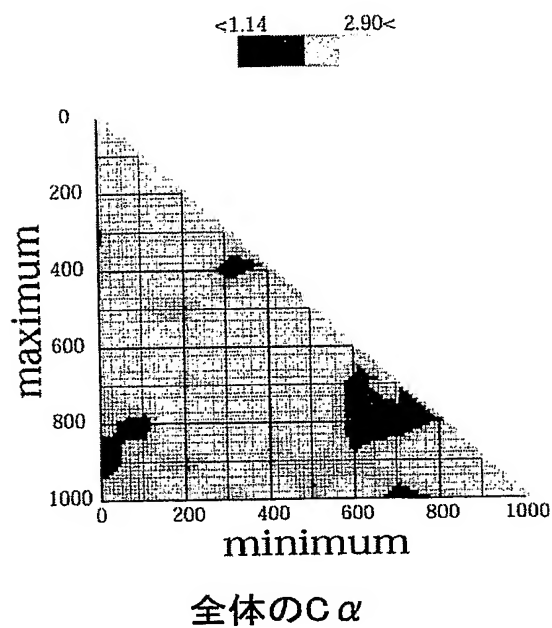




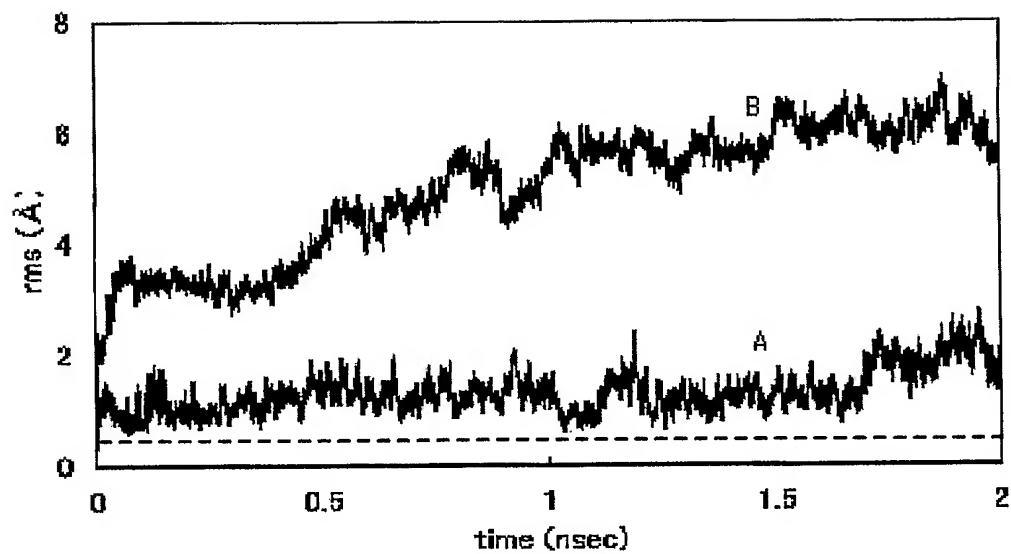
【図 17】



【図 18】

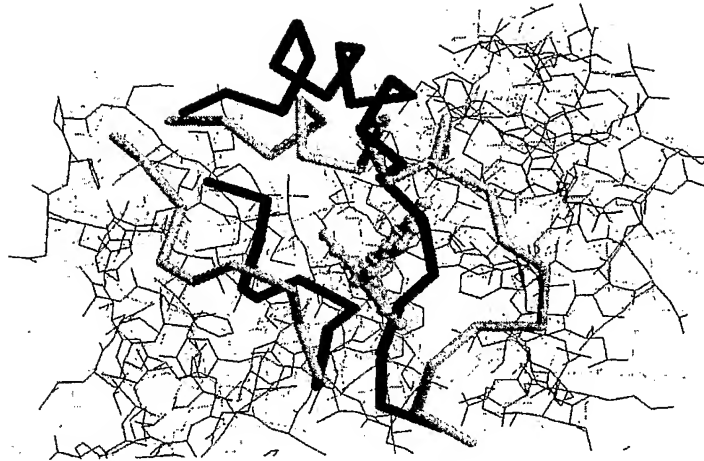


【図 19】

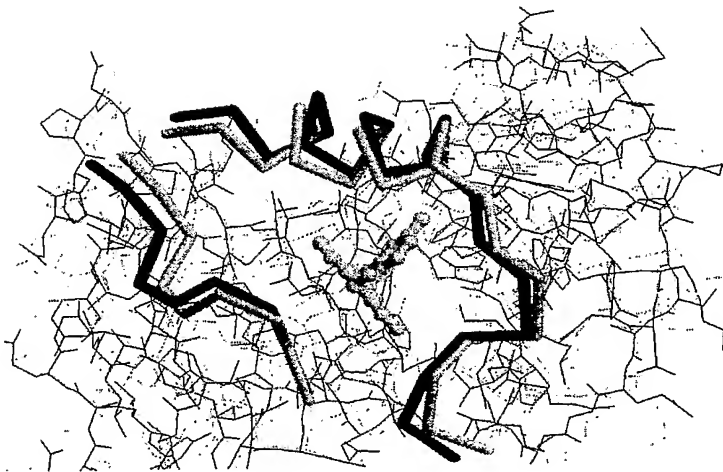




【図 20】



【図 21】





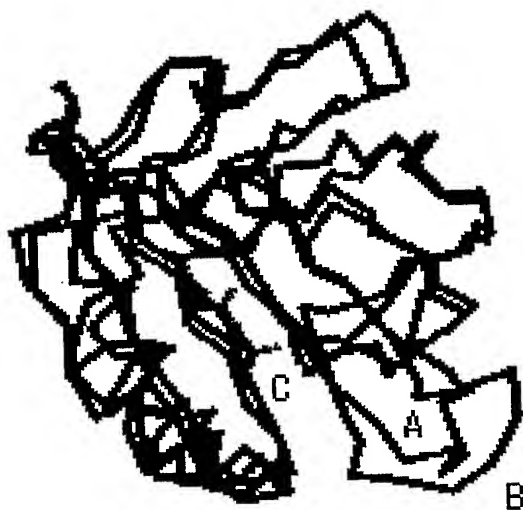
【図 22】

>1CBQ  
PNFSGNWKIIRSENFEELLKVLGVNVMRLRKIAVAAASKPAVEIKQEGDTFYIKTSTTVRTTEINFKVGEEFEEQTVDGRP  
CKSLVKWESENKMVCEQKLLKGEPKTSWTREL TNDGELIL TMTADDVWCTRVVYRE  
>1ICM  
-AFDGTWVDRNENYEKFMKMGINVVKRKL G-AHDNLKLTITQEGNKFTVKESNFRNIDVVFELGVDFAYSLADGTE  
L-TGTWTMEGNKLVGKFKRV-DNGKELIAVREIS-GNELIQTYTYEGVEAKRIFKKE

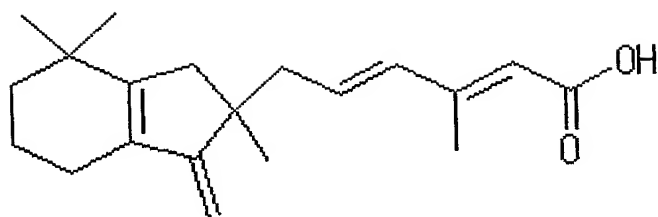




【図 23】



【図 24】

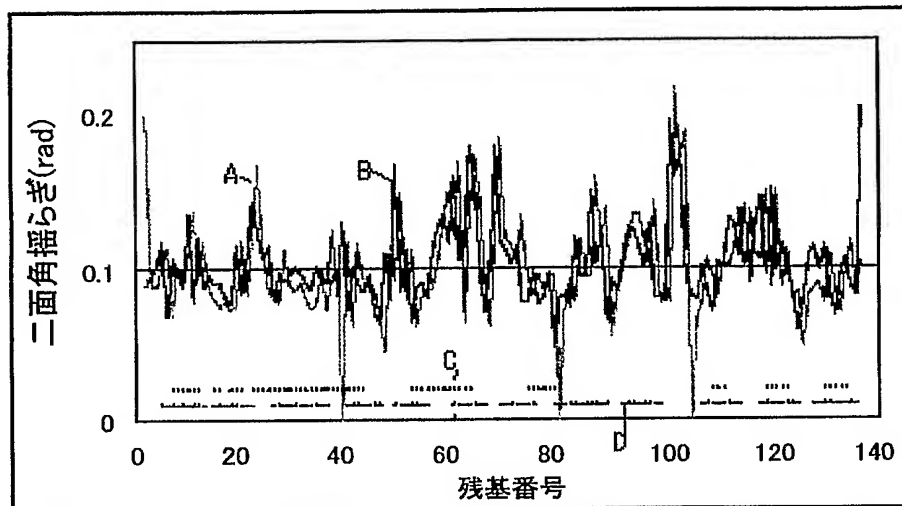




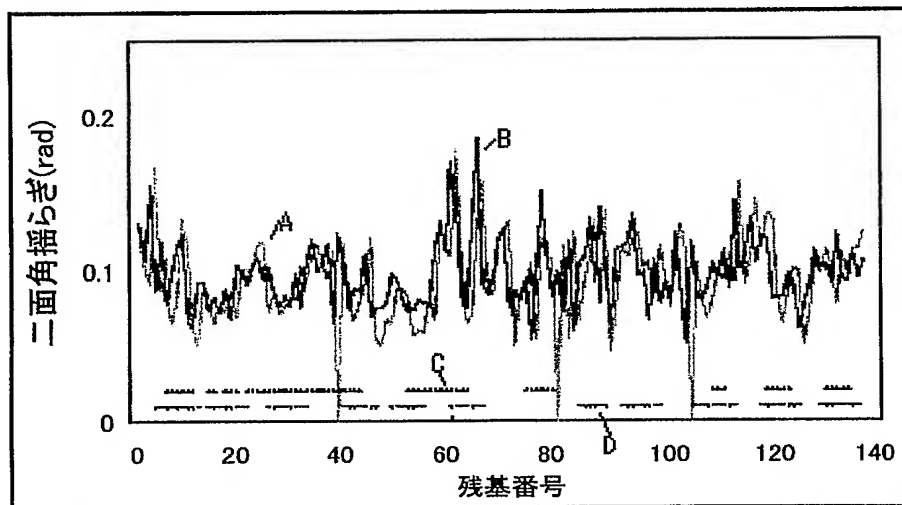
【図 25】

X線構造	1CBQ
参照タンパク質	1ICM
ホモロジー(%)	32.1
残基数	136
活性部位の主鎖(Å)	2.2487
活性部位の側鎖(Å)	3.2446
活性部位の全原子(Å)	2.7728
全体の主鎖(Å)	2.2075
全体の側鎖(Å)	3.7881
全体の全原子(Å)	3.0959

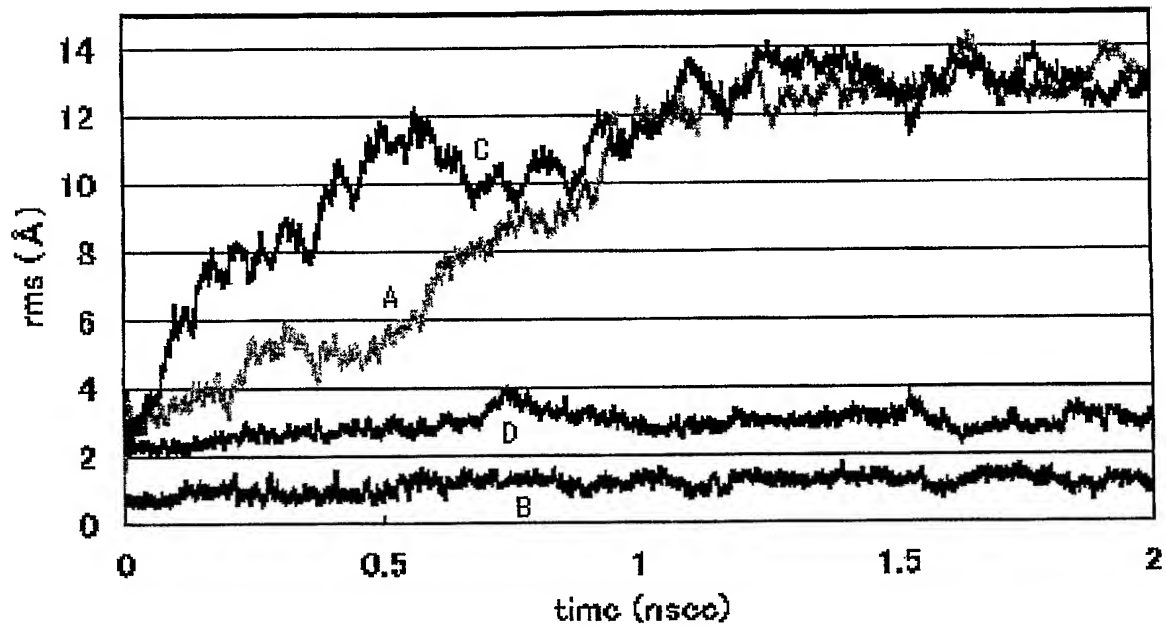
【図 26】



【図 27】



【図 28】

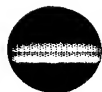




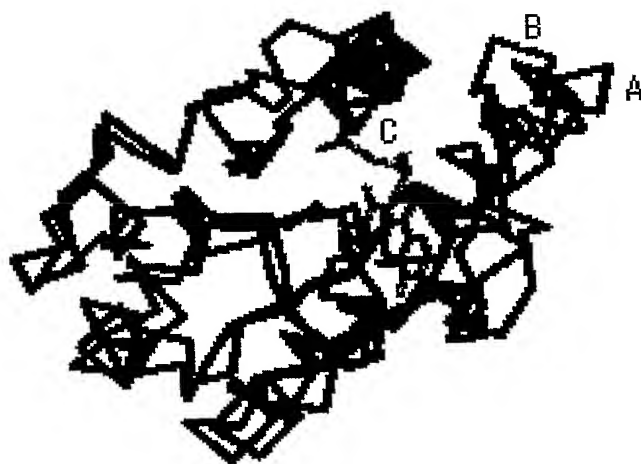
【図 2 9】

```

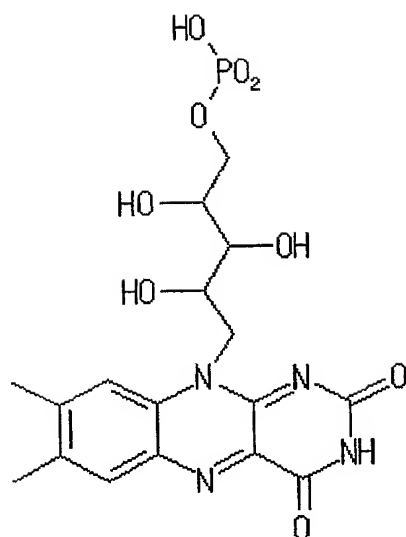
>1J9G
AKALIVYGSTTGNTTEYTAETIARELADAGYEVDSRDAASVEAGGLFEGFDLVLLGCSTWGD--DCIELQDDFIPLFDSLEE
TGAQGRKVACFGCGDS--SYEYFCGAVDAIEEKLKNLGAIEVQDG-----LRIDGDPRAARDDI
VGWAHDVVRGAI
>1AHN
AITGIFFGSDTGNTEINIAKMIQKQLGKDVADVHDIKSSKE---DLEAYDILLGPTWYGY---EAQCDWDDFFPTLEE
IDFNGKLVALFGCGDQEDYAEYFCDALGTIRDIIEPRGATVGHWPTAGYHFEASKGLADDDHFFVGLAIDEDRQPELTAE
RVEKWKQISE
    
```

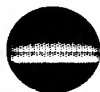


【図 30】



【図 31】

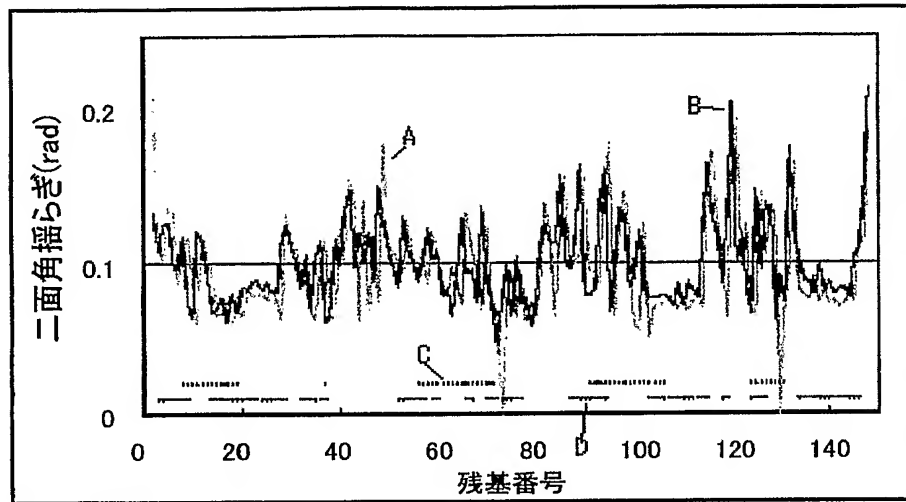




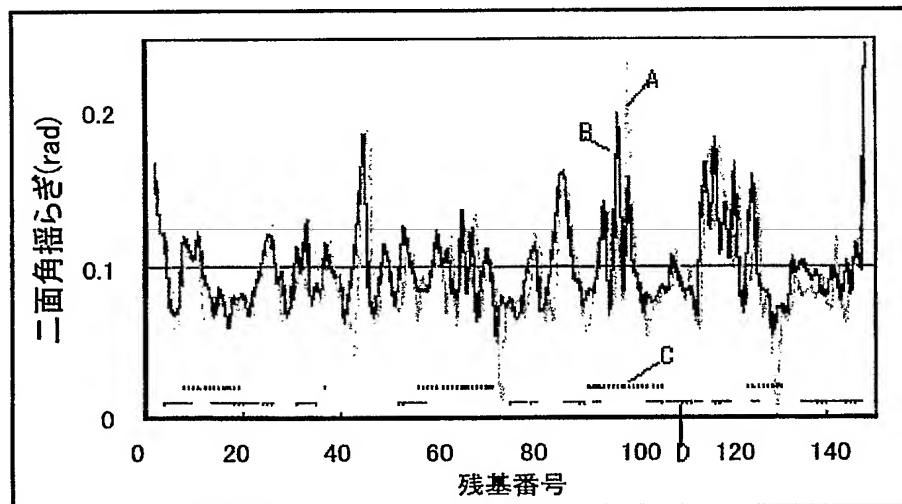
【図 3 2】

X線構造	1J9G
参照タンパク質	1AHN
ホモロジー(%)	29.2
残基数	147
活性部位の主鎖(Å)	2.3909
活性部位の側鎖(Å)	4.5774
活性部位の全原子(Å)	3.5753
全体の主鎖(Å)	3.1212
全体の側鎖(Å)	5.367
全体の全原子(Å)	4.315

【図 3 3】

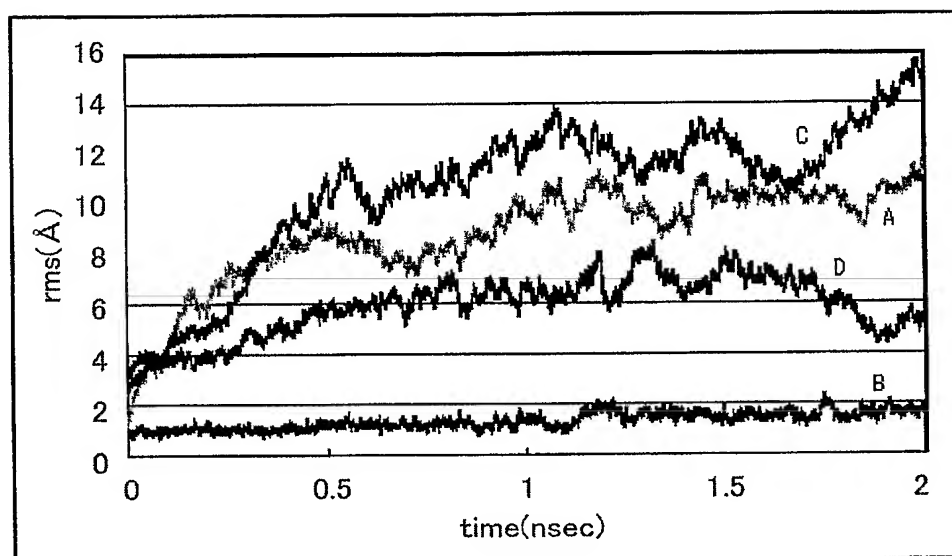


【図 3 4】





【図 35】



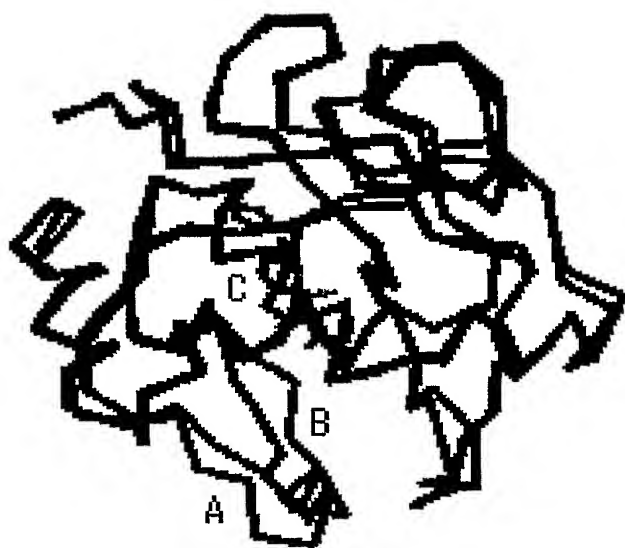


【図 36】

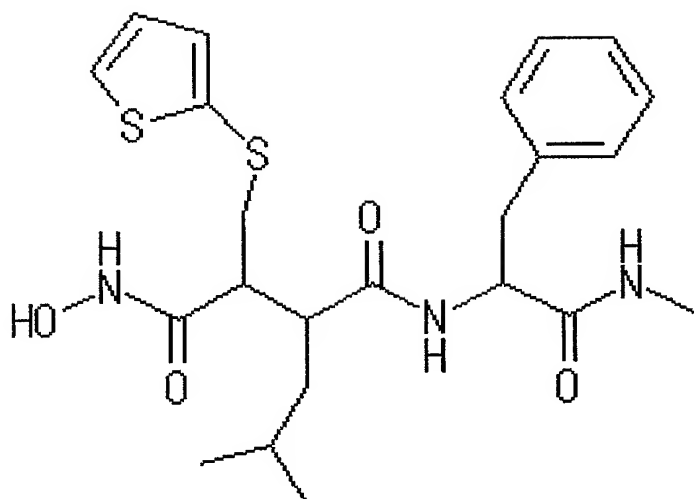
>1MMB  
NPKWERTNLT YRIRNYTPQLSEAEVERAIKDAFELWSVASPLIFTRISQGEADINIAFYQRDHGDNSPFDGPNGLAHAF  
QPGQGIGGDAHFDAEETWTNTSANYNLFLVAAHEFGHSLGLAHSSDPGALMYPNYA-FRETSNYSLPQDDIDGIGAIYG  
>1B3D\_A  
IPKWRKTHLTYRIVNYTPDLPKDAVDSAVEKALKVWEEVTPLTFSRLYEGEADIMISFAVREHGDFYPFDGPGNVLAHAY  
APGPGINGDAHFDDDEQWTKDTTGTNLFLVAAHEIGHSLGLFHSANTEALMYPLYHSLTDLTRFRLSQDDINGIGSLYG

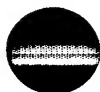


【図 37】



【図 38】

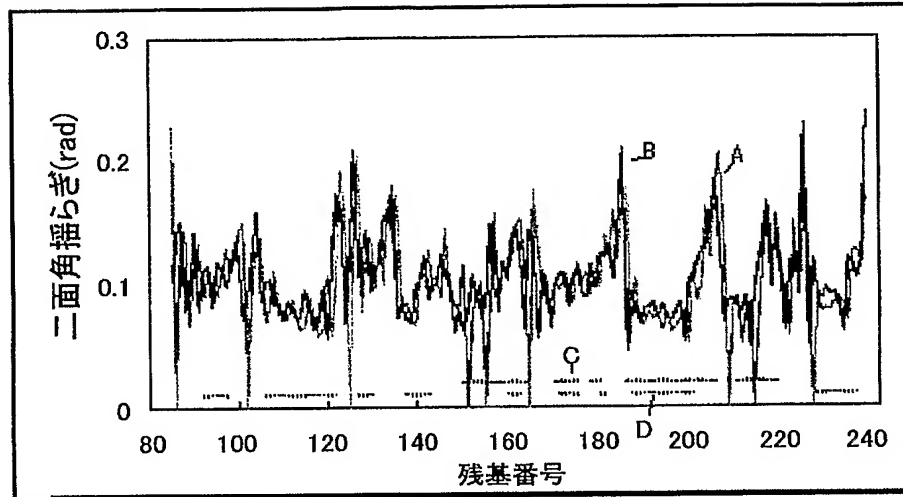




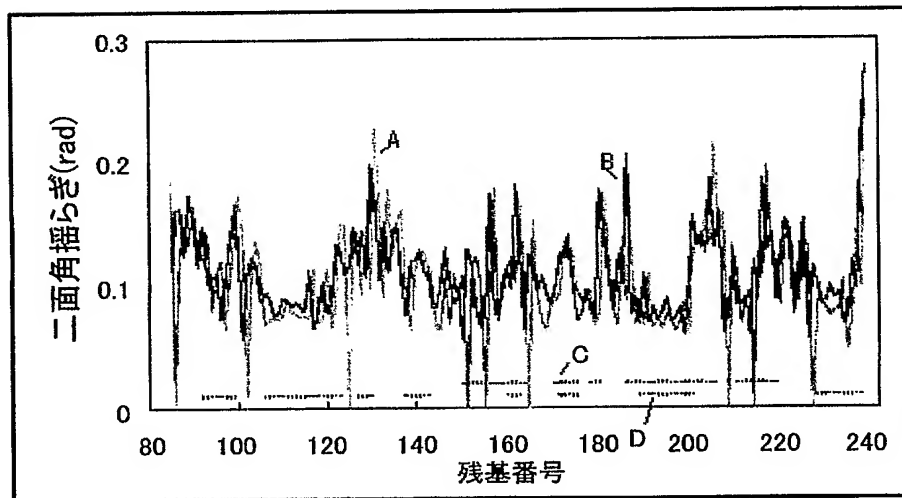
【図 39】

X線構造	1MMB
参照タンパク質	1B3D
ホモロジー(%)	55
残基数	158
活性部位の主鎖(Å)	0.9442
活性部位の側鎖(Å)	3.0756
活性部位の全原子(Å)	2.2417
全体の主鎖(Å)	1.1339
全体の側鎖(Å)	2.5715
全体の全原子(Å)	1.9808

【図 4 0】

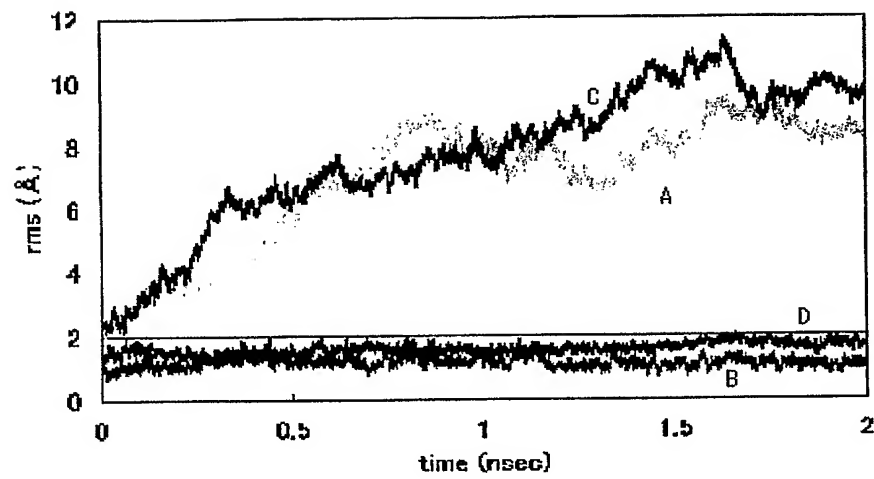


【図 4 1】

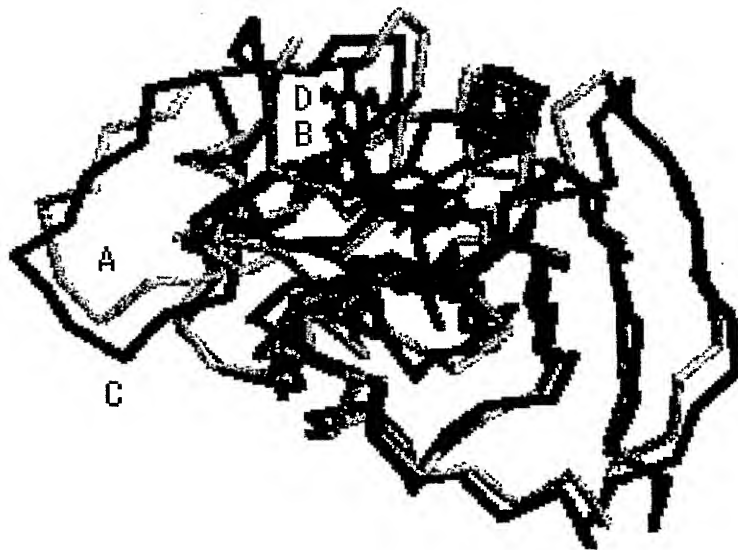


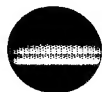


【図 4 2】

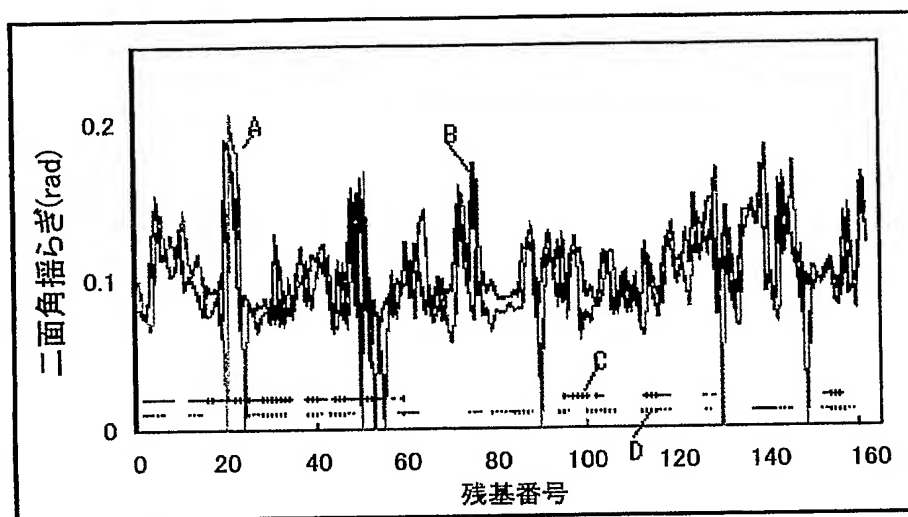


【図 4 3】

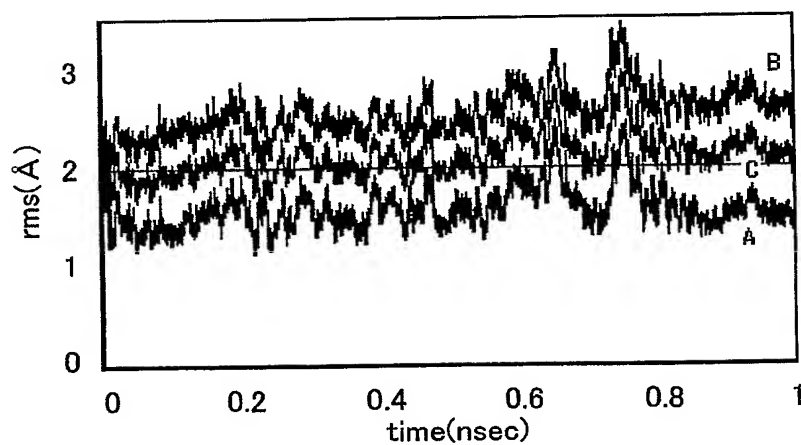




【図 4 4】



【図 4 5】



【図 4 6】

活性部位の原子	リガンドの原子タイプ	相互作用の強さ	相互作用の距離(Å)
LUE4 O	N.pl3	300	2.87
ASP26 OD1	N.ar	300	3.00
ASP26 OD2	N.pl3	300	3.00

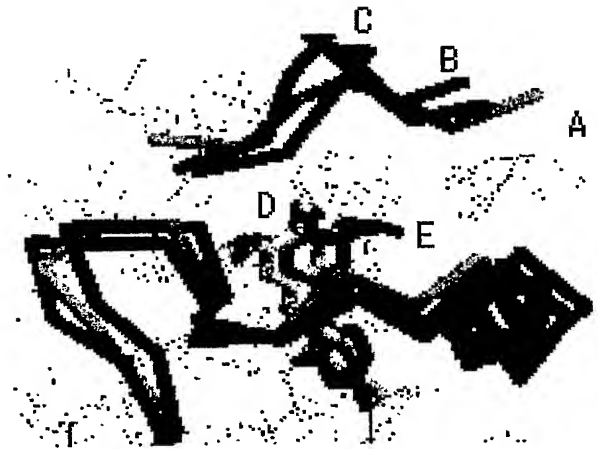
【図 4 7】

区間(nsec)	間隔(fsec)	クラスター数	主鎖(Å)	全原子(Å)	リガンド(Å)
初期構造			1.5313	1.9190	
0~0.1	100	11	1.3531	1.8612	1.2734
0~1.0	100	204	1.2522	1.8116	0.9614
0~1.0	1000	26	1.2522	1.8116	0.8169

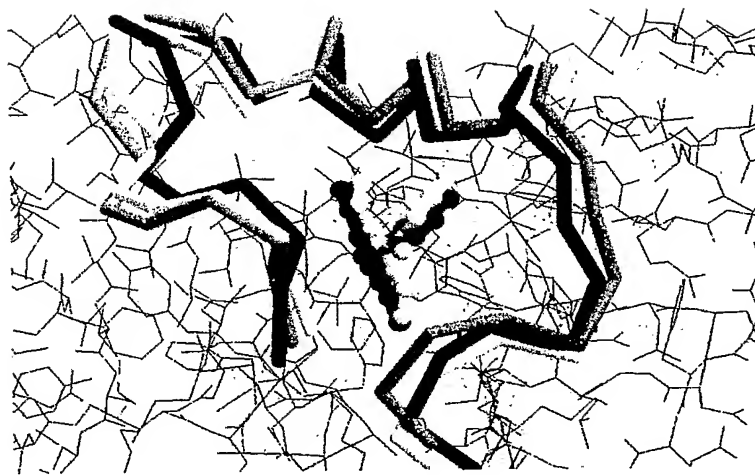




【図 48】

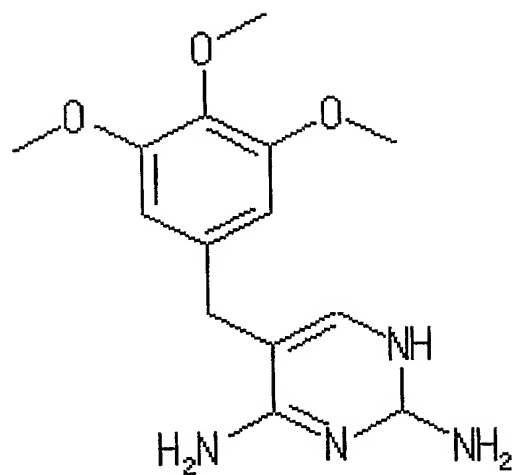


【図 49】

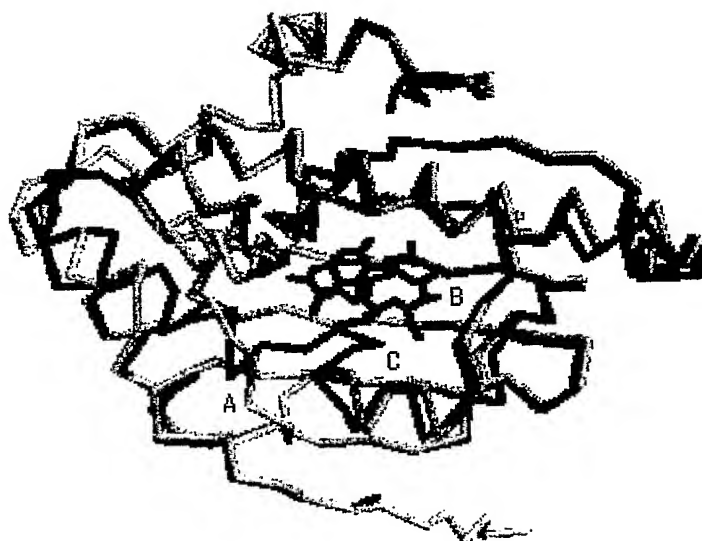




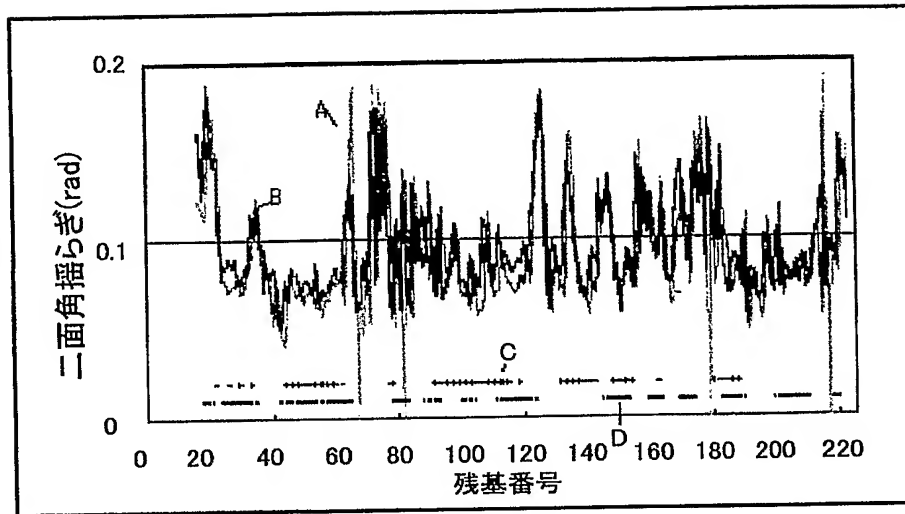
【図 50】



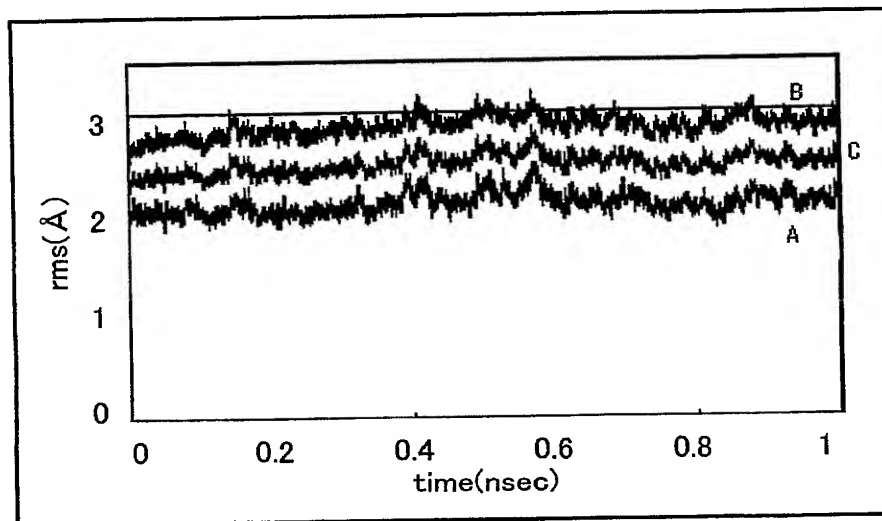
【図 51】



【図 5 2】



【図 5 3】





【図 5 4】

活性部位の原子	リガンドの原子タイプ	相互作用の強さ	相互作用の距離(Å)
LYS58 NZ	O.3	300	2.8
ASP93 OD2	N.am	300	2.8
PHE138 N	O.2	300	2.8

【図 5 5】

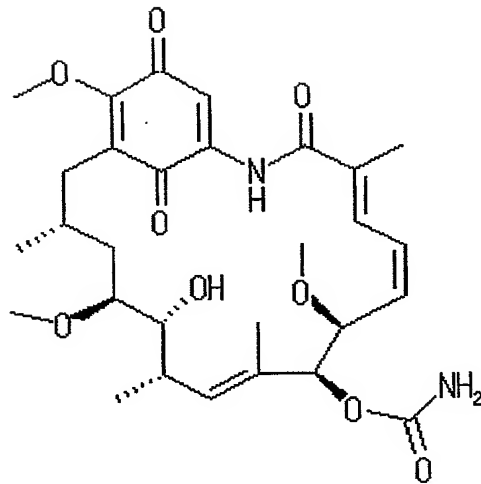
区間(nsec)	間隔(fsec)	クラスター数	主鎖(Å)	全原子(Å)	リガンド(Å)
初期構造			2.0144	2.2600	
0~0.1	100	6	1.8525	2.2601	1.2081
0~1.0	100	133	1.9139	2.3883	1.5932
0~1.0	1000	9	1.9764	2.8421	0.9667



【図 56】



【図 57】

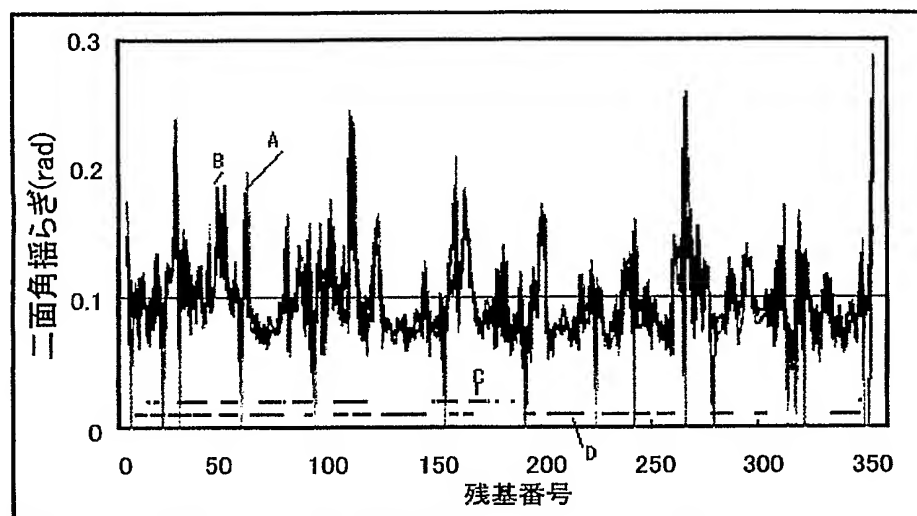




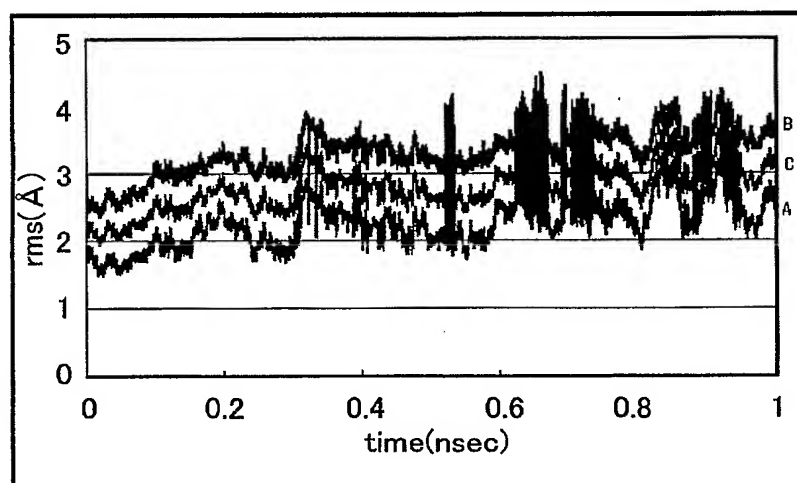
【図 58】

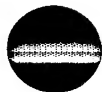


【図 59】



【図 60】





【図 6 1】

活性部位の原子	リガンドの原子タイプ	相互作用の強さ	相互作用の距離(Å)
LEU75 CD1	F	300	3.6
LEU75 CD2	F	300	3.6
MET109 N	N.ar	300	2.7

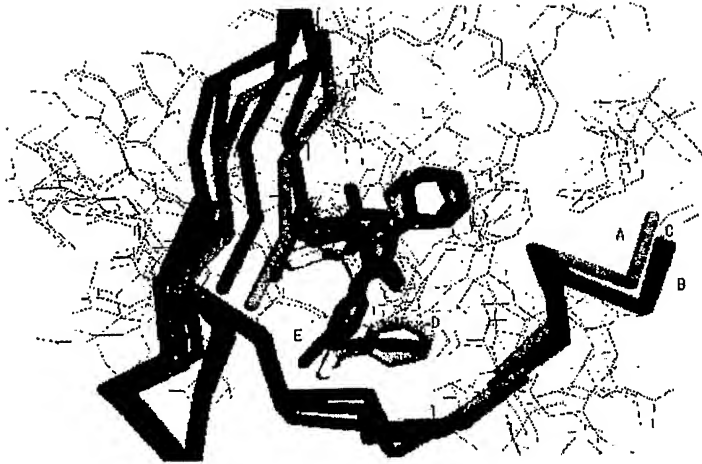
【図 6 2】

区間(nsec)	間隔(fsec)	クラスター数	主鎖(Å)	全原子(Å)	リガンド(Å)
初期構造			1.7972	2.1606	
0~0.1	100	5	1.6101	2.0766	1.6112
0~1.0	100	319	1.7236	2.2843	1.4550
0~1.0	1000	31	1.7236	2.2843	1.4571





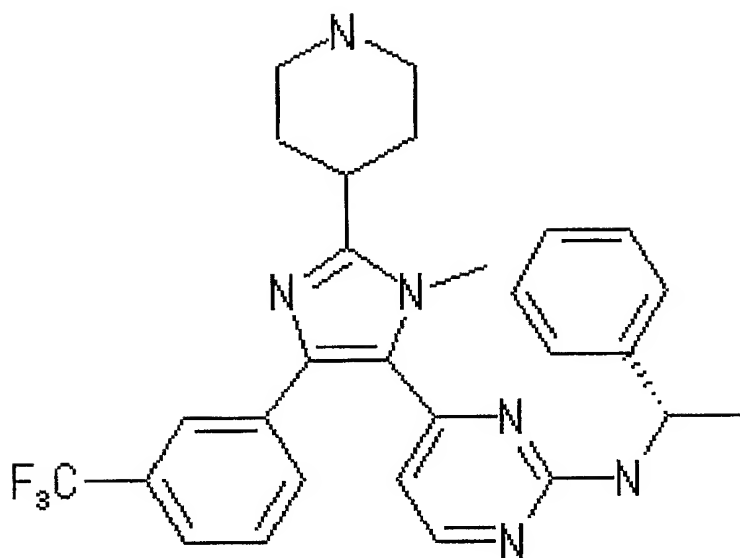
【図 6 3】



【図 6 4】



【図 65】



【図 66】



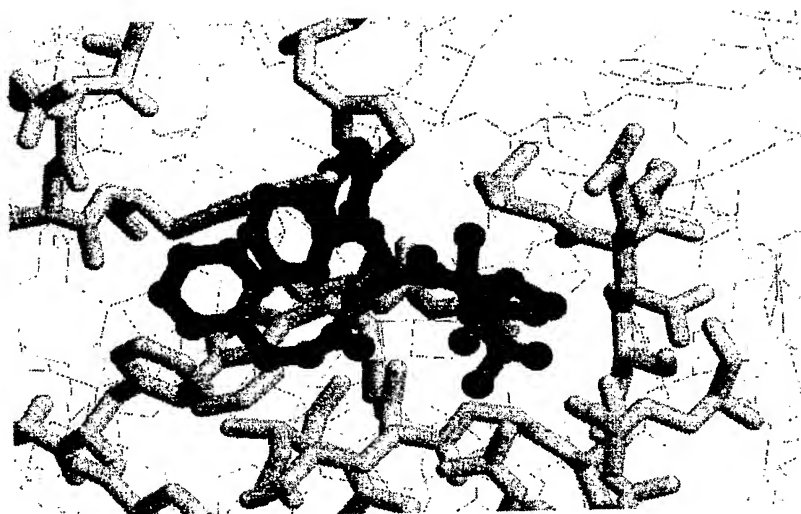
【図 67】

ランキング	相互作用エネルギー	PDBcode	ランキング	相互作用エネルギー	PDBcode
[001]	-3847.2147	4PGT	[002]	-3671.4754	1MP7
[003]	-3056.6135	1BMN	[004]	-2923.8680	1I32
[005]	-2872.4420	5FWG	[006]	-2608.5702	1LHF
[007]	-2528.6110	1BX6	[008]	-2439.5657	1B8Y
[009]	-2433.9052	1EZF	[010]	-2382.8539	5LDH
[011]	-2248.0139	1FVP	[012]	-2247.3089	1JJQ
[013]	-2133.5942	1IL2	[014]	-2128.4540	1BJI
[015]	-2125.1405	1DMT	[016]	-2103.1434	1K22
[017]	-2092.6654	1HY7	[018]	-2025.5091	966C
[019]	-2013.9064	1AIX	[020]	-1989.1635	1A4Q
[021]	-1946.4497	1VZE	[022]	-1932.9896	1KVO
[023]	-1928.3650	1D6V	[024]	-1901.6172	1C0A
[025]	-1890.2208	1DB5	[026]	-1867.0754	1GUH
[027]	-1855.6184	1QIN	[028]	-1817.4767	1M21
[029]	-1782.5387	1KCI	[030]	-1766.9010	1KZK
[031]	-1728.2876	6GSX	[032]	-1709.9359	2PRG
[033]	-1699.2351	1NPW	[034]	-1694.4086	2UPJ
[035]	-1661.4315	1AUJ	[036]	-1658.1970	1HFR
[037]	-1654.2430	1DMP	[038]	-1599.5870	1FOR
[039]	-1595.7907	2GSQ	[040]	-1569.9256	1QHC
[041]	-1530.3871	1AIM	[042]	-1481.1846	1EL3
[043]	-1473.7372	1QH5	[044]	-1453.3935	1LHC
[045]	-1411.1465	1HFC	[046]	-1389.8129	2FMB
[047]	-1372.1506	1GFW	[048]	-1352.8868	1EM6
[049]	-1329.5658	1AU0	[050]	-1306.5704	1M9B
[051]	-1287.3729	1EAS	[052]	-1265.8962	1LHE
[053]	-1248.8527	1C8T	[054]	-1244.2458	1MMQ
[055]	-1216.6454	1QIP	[056]	-1200.9810	207D
[057]	-1175.5120	1HWL	[058]	-1138.1881	4UPJ
[059]	-1112.7163	3GST	[060]	-1068.0641	1LEE
[061]	-1030.5972	1GA9	[062]	-1030.4960	1OD7
[063]	-1029.0345	1HOV	[064]	-1018.1686	1LF2
[065]	-1011.9100	1ODY	[066]	-976.1041	1CQQ
[067]	-948.0992	1G2K	[068]	-936.9058	2AIM
[069]	-934.4739	1NWL	[070]	-924.6255	6FIV
[071]	-902.7587	1YEI	[072]	-900.4131	1MXT
[073]	-894.5544	1YEF	[074]	-874.9274	1DZT
[075]	-857.5373	1QF0	[076]	-851.1669	1EGV
[077]	-844.2406	1F29	[078]	-824.5393	1KV2
[079]	-820.4913	456C	[080]	-775.9659	1K1M
[081]	-766.8359	1JR4	[082]	-763.2825	2KCE
[083]	-739.3676	1KN4	[084]	-733.8593	1RT2
[085]	-728.8765	1HPV	[086]	-718.5795	2BBQ
[087]	-705.3978	1MS6	[088]	-695.0241	1IF7
[089]	-689.7998	1JIL	[090]	-684.7289	1A8J
[091]	-676.3861	1FL3	[092]	-628.8081	1CIZ
[093]	-619.2121	1DIF	[094]	-604.7057	2BPX
[095]	-598.4143	1IF9	[096]	-564.5807	1K0C
[097]	-561.6472	1KN2	[098]	-541.1021	1HBV
[099]	-507.6808	1DB4	[100]	-496.0550	1K1J

太字: 1AIX中に含まれているリガンド  
斜線: セリンプロテアーゼ

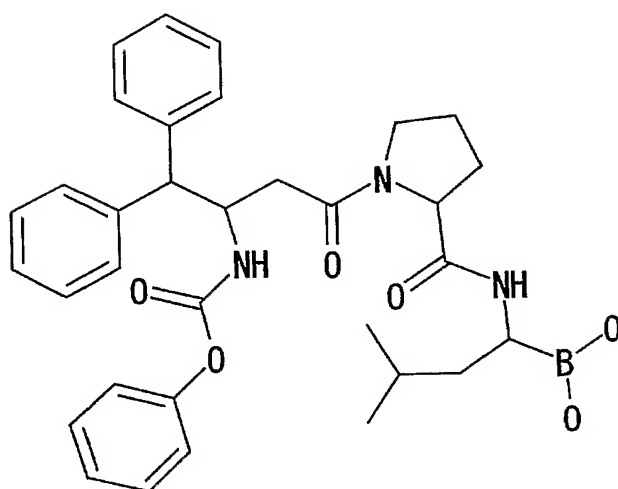


【図 68】



ランキング19

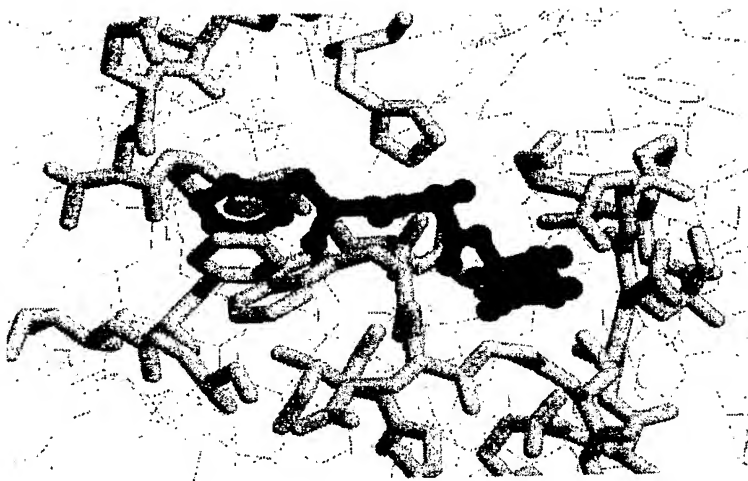
【図 69】



1AIX中のリガンド

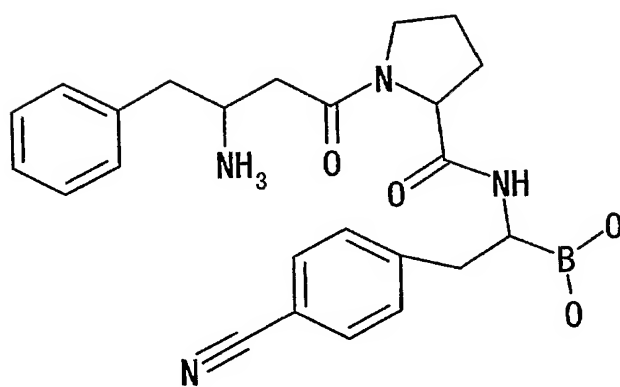


【図 70】



ランキング35

【図 71】



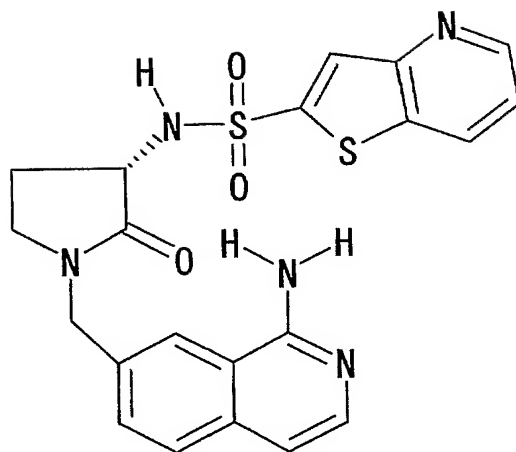
1AUJ中のリガンド

【図 7 2】



ランキング38

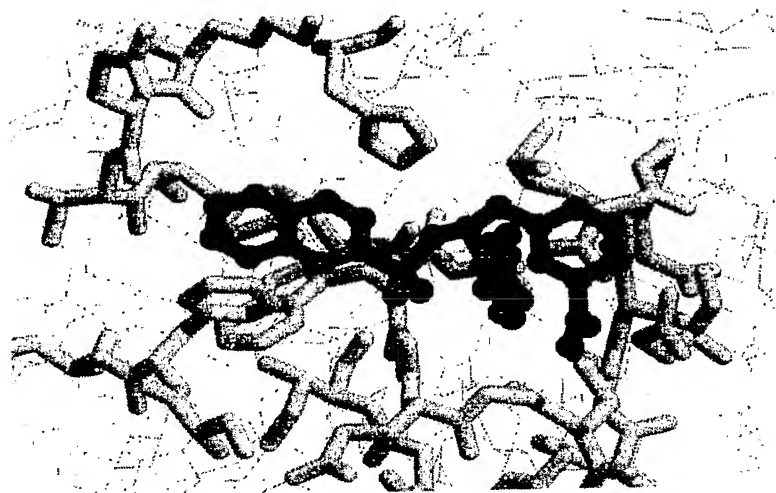
【図 7 3】



1FOR中のリガンド

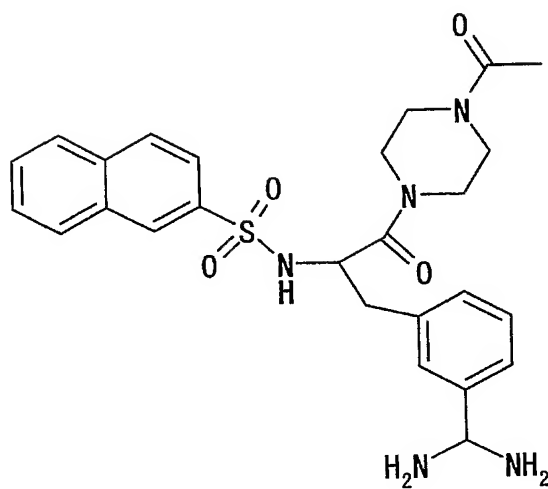


【図 7 4】



ランキング80

【図 7 5】

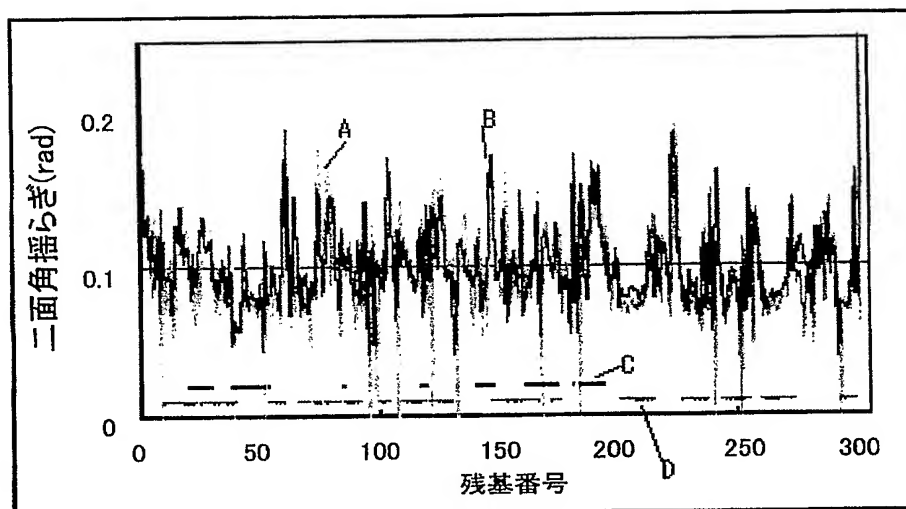


1KIM中のリガンド

【図 7 6】

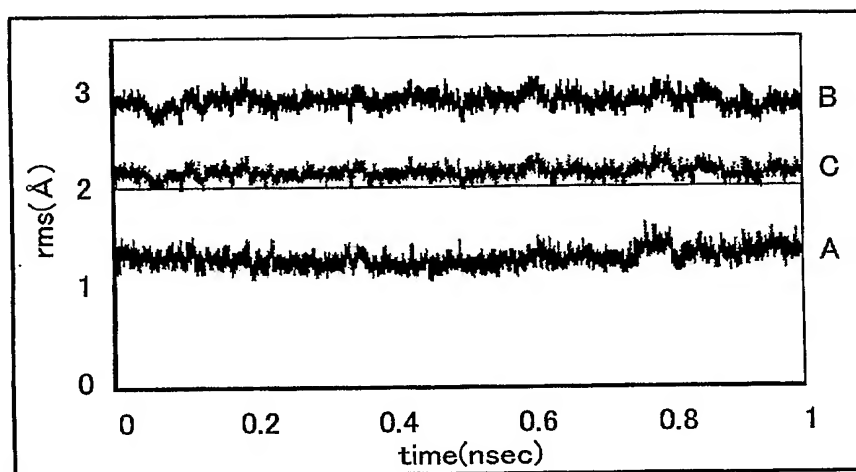


【図 7 7】





【図 78】



【図 79】

活性部位の原子	リガンドの原子タイプ	相互作用の強さ	相互作用の距離(Å)
CYS145 N	O.co2	100	2.70
MET165 CG	C.3	100	4.00
GLU166 N	O.2	100	2.70
THR190 N	O.3	100	2.70

【図 80】

順位	エネルギー	PDB code	備考
1	-1089.2153	1QF4	ligase
2	-990.9917	1KZL	transferase
3	-906.5003	1C0A	ligase/RNA
4	-889.1661	1KGQ	transferase
5	-869.3531	1I95	ribosome
6	-860.2331	1JR4	transferase
7	-858.0005	1A2N	transferase
8	-832.0515	1NKK	hydrolase
9	-788.3545	1JIL	ligase
10	-757.2852	1EJB	transferase
11	-697.9477	1DMT	hydrolase
12	-645.0269	1PAU	complex (protease/inhibitor)
13	-633.1260	1F74	lyase
14	-628.9678	1KYU	endocytosis/exocytosis
15	-616.4458	1NRS	serine proteinase/receptor
16	-608.4169	9LYZ	hydrolase (o-glycosyl)
17	-600.2775	1EIO	lipid-binding protein
18	-593.7082	1F7B	lyase
19	-585.7663	1LMW	complex (serine protease/inhibitor)
20	-584.0059	1R1R	oxidoreductase
21	-580.1563	1IL2	ligase/RNA
22	-573.0481	1BLL	hydrolase(alpha-aminoacylpeptide)
23	-572.6763	1E1F	glycoside hydrolase
24	-540.1965	1LKL	complex (tyrosine kinase/peptide)
25	-524.2817	1UK4	hydrolase
26	-518.3528	1LCB	transferase (methyltransferase)
27	-506.8123	1PGN	oxidoreductase (choh(d)-nadp+(a))
28	-493.5477	1I5Q	hydrolase
29	-486.8954	1KYD	endocytosis/exocytosis
30	-481.9659	1NRR	serine proteinase/receptor



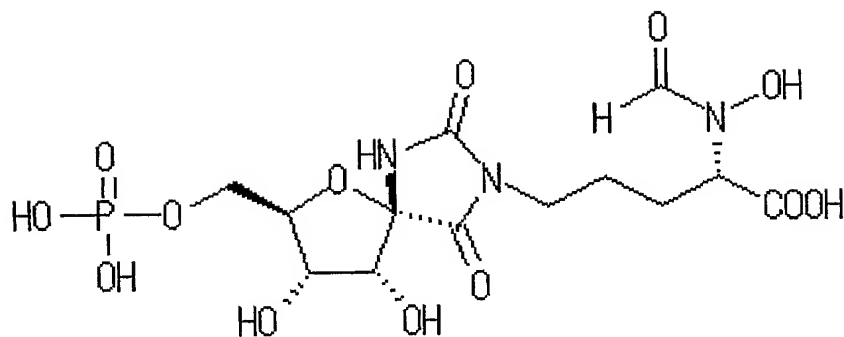
【図 8 1】



【図 8 2】



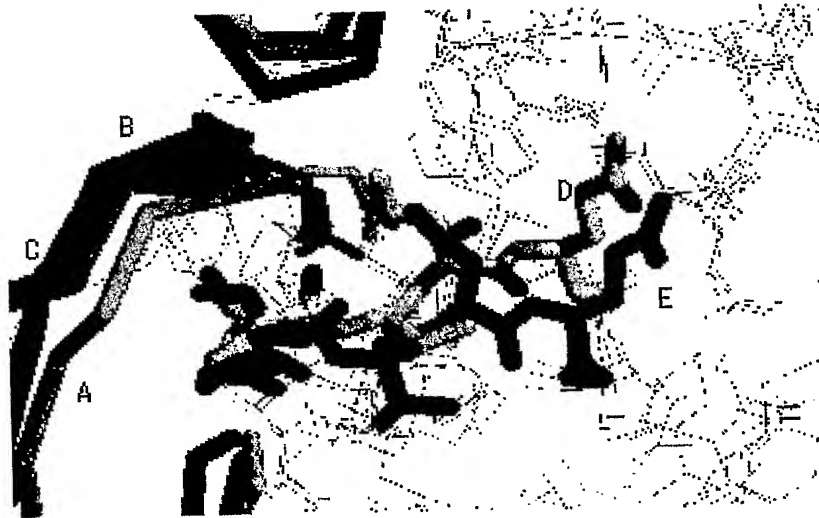
【図 8 3】



【図 8 4】

活性部位の原子	リガンドの原子タイプ	相互作用の強さ	相互作用の距離 (Å)
CYS145 N	O.co2	100	2.70
GLUの166 N	O.2	100	2.70
THR190 N	O.3	100	2.70

【図 85】



【図 86】

順位	エネルギー	PDB code	備考
1	-1263.8870	1EAD	dihydrolipoamide acetyltransferase
2	-1260.8689	1F6M	oxidoreductase
3	-1147.1739	1JR4	transferase
4	-1141.9917	1QF5	ligase
5	-1104.9447	1JAY	structural genomics
6	-1019.3584	1KZL	transferase
7	-996.5865	1QF4	ligase
8	-988.6588	1JIJ	ligase
9	-981.8594	8ICO	complex (nucleotidyltransferase/dna)
10	-953.0986	1LO9	hydrolase
11	-949.1903	1JTU	transferase
12	-922.4795	1JKX	transferase
13	-918.4892	1JIL	ligase
14	-916.9950	1I95	ribosome
15	-908.4880	1AL6	lyase
16	-893.5862	1LKL	complex (tyrosine kinase/peptide)
17	-892.3713	1N37	deoxyribonucleic acid
18	-887.9721	1LCB	transferase (methyltransferase)
19	-866.9600	1O9F	protein binding
20	-826.4893	1LO7	hydrolase
21	-792.0254	4UAG	ligase
22	-776.9998	1EJB	transferase
23	-772.2400	1BFZ	n-terminal product peptide
24	-769.6844	1F9E	apoptosis
25	-762.5275	1TLP	hydrolase (metalloproteinase)
26	-759.8312	1QIN	lyase
27	-758.2140	1KO6	transferase
28	-757.5526	1C0A	ligase/RNA
29	-755.7987	1QD1	transferase
30	-755.1049	1LO8	hydrolase
49	-639.1858	1UK4	hydrolase

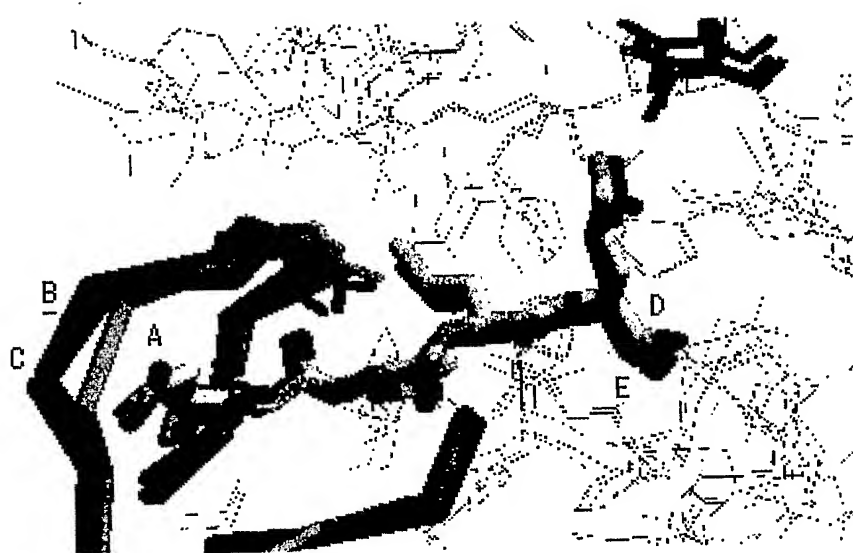
【図 87】

活性部位の原子	リガンドの原子タイプ	相互作用の強さ	相互作用の距離(Å)
THR25 OG1	N.am	100	3.80
CYS145 N	O.co2	100	2.70
MET165 CG	C.3	100	4.00
GLU166 N	O.2	100	2.70
THR190 N	O.3	100	2.70

【図 88】

順位	エネルギー	PDB code	備考
1	-364.6548	1I95	ribosome
2	-299.0166	1UK4	hydrolase
3	-109.6867	1BXX	endocytosis/exocytosis
4	-93.0540	1KZL	transferase
5	-72.9399	1NKK	hydrolase
6	-10.7565	1F8H	endocytosis/exocytosis
7	-4.2756	1QTN	apoptosis
8	162.1557	1KGQ	transferase
9	163.2075	1O9F	protein binding
10	331.8725	1CGL	metalloprotease
11	370.5027	2BBQ	transferase(methyltransferase)
12	397.8488	4DMR	oxidoreductase
13	550.2598	1HPG	hydrolase (serine protease)
14	716.6561	1LOC	lectin
15	839.7398	1DMT	hydrolase
16	848.7090	1KAP	zinc metalloprotease
17	850.2630	1JG3	transferase
18	883.4400	1BC5	complex (methyltransferase/peptide)
19	905.9695	1FCH	signaling protein
20	913.9769	1CF8	catalytic antibody
21	1088.2428	1NWE	hydrolase
22	1089.3496	1KO6	transferase
23	1116.9042	1F74	lyase
24	1131.4783	1ING	hydrolase (o-glycosyl)
25	1132.3648	1I31	endocytosis/exocytosis
26	1148.9063	1IAU	hydrolase
27	1156.0335	1B48	transferase
28	1160.3512	1PTT	complex (hydrolase/peptide)
29	1176.7814	1MC5	oxidoreductase
30	1197.3565	1F9E	apoptosis

【図 89】



【図 90】

活性部位の原子	リガンドの原子タイプ	相互作用の強さ	相互作用の距離 (Å)
CYS145 N	アクセプター	100	2.70
MET165 CG	炭素	100	4.00
GLU166 N	アクセプター	100	2.70
THR190 N	アクセプター	100	2.70



【図 91】

順位	エネルギー	PDB code	備考
1	-2095.8588	1JJQ	hormone/growth factor
2	-2011.3626	2BVW	hydrolase
3	-1670.8384	1DOG	hydrolase
4	-1336.7960	1LWJ	transferase
5	-1320.0704	1KEU	lyase
6	-1230.0604	1GAH	hydrolase
7	-1214.9459	1I7E	signaling protein
8	-1195.8653	1C39	signaling protein
9	-1191.3777	1BB5	hydrolase
10	-1189.0253	2FHI	nucleotide-binding protein
11	-1147.9761	1GO6	glycopeptide antibiotics
12	-1103.6272	1M4D	transferase
13	-1095.3050	1QHC	hydrolase
14	-1088.7299	1M2N	gene regulation
15	-1078.3684	1QGL	lectin (agglutinin)
16	-1056.4078	4ENG	glycosyl hydrolase
17	-1033.0227	1LON	ligase
18	-1031.2555	1MWL	ribonucleic acid
19	-1027.4239	1QPK	hydrolase
20	-1014.9817	1UDB	isomerase
21	-1005.1689	1GQC	transferase
22	-976.9293	1H6H	px domain
23	-975.2827	1LSP	hydrolase (o-glycosyl)
24	-973.5218	1FF1	signaling protein
25	-963.4098	3UAG	ligase
26	-937.2165	1IBG	immunoglobulin
27	-933.6818	1DRV	oxidoreductase
28	-918.6947	2MBR	oxidoreductase
29	-917.1703	1NAB	deoxyribonucleic acid
30	-897.3026	1SLY	glycosyltransferase
774	331.9928	1UK4	hydrolase

【図 9 2】



【図 9 3】

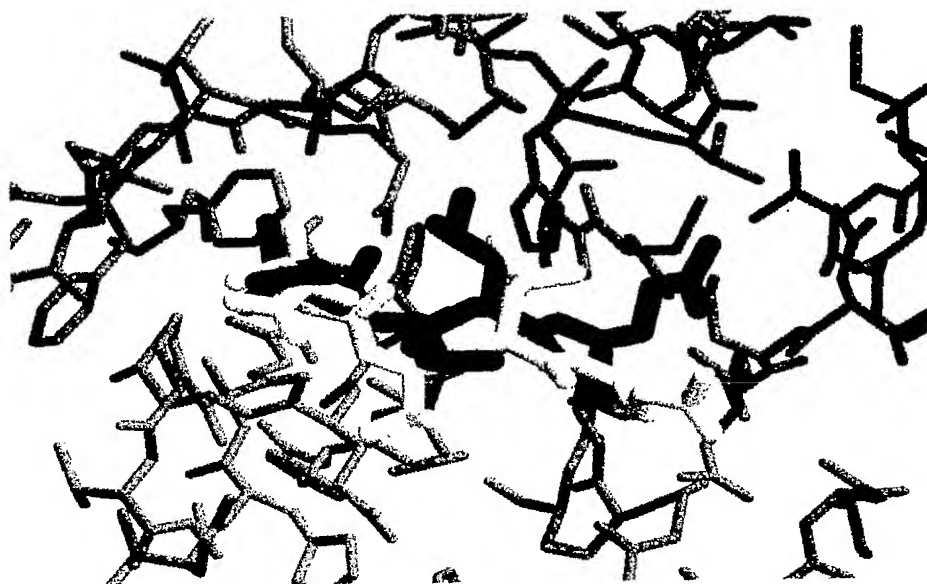
活性部位の原子	リガンドの原子タイプ	相互作用の強さ	相互作用の距離(Å)
CYS145 N	O.co2	100	2.70
MET165 CG	C.3	100	4.00
GLU166 N	O.2	100	2.70
THR190 N	O.3	100	2.70

【図 9 4】

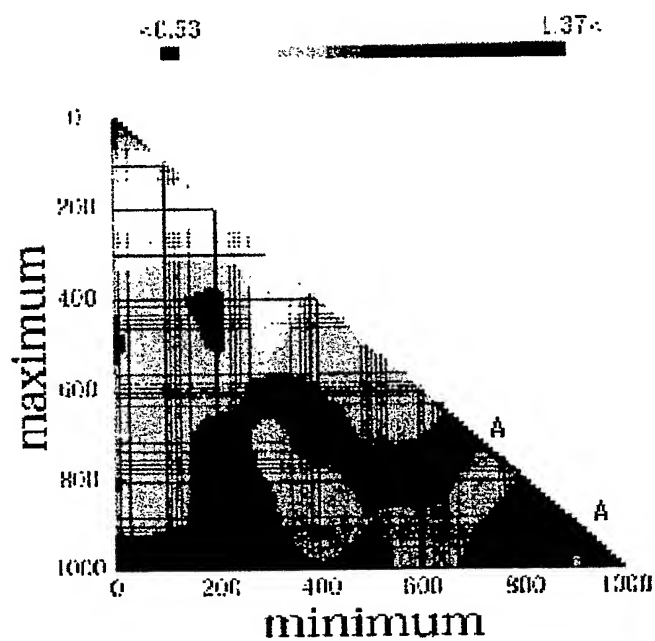
順位	エネルギー	PDB code	備考
1	-1047.3743	1KZL	transferase
2	-860.437	1J71	hydrolase
3	-844.8737	3UAG	ligase
4	-837.6255	1LKL	complex (tyrosine kinase/peptide)
5	-829.8176	1QF4	ligase
6	-732.2087	1A2N	transferase
7	-721.6213	1G1F	hydrolase, signaling protein
8	-698.5922	1F7B	lyase
9	-689.1472	1BFZ	n-terminal product peptide
10	-646.7943	148L	hydrolase(o-glycosyl)
11	-634.4654	1CGL	metalloprotease
12	-629.1673	1JIL	ligase
13	-616.8733	1FF1	signaling protein
14	-611.1171	1F9E	apoptosis
15	-567.0738	1R1R	oxidoreductase
16	-554.5321	1I95	ribosome
17	-547.2494	1FQX	hydrolase
18	-536.7069	1HCT	complex (signal transduction/peptide)
19	-531.1014	1SIA	mucin motif
20	-508.9899	1JIJ	ligase
21	-507.9655	1LSP	hydrolase (o-glycosyl)
22	-497.6341	1F8H	endocytosis/exocytosis
23	-492.3974	1F74	lyase
24	-443.232	1QH5	hydrolase
25	-427.5925	1JII	ligase
26	-417.4991	1JQY	toxin
27	-416.9956	2KCE	methyltransferase
28	-396.7898	1EJB	transferase
29	-387.6441	1MMJ	hydrolase
30	-358.2162	1SLY	glycosyltransferase
39	-245.9500	1UK4	hydrolase



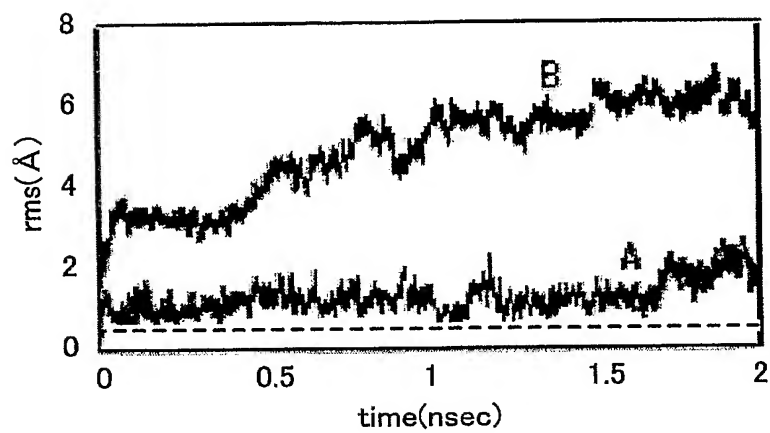
【図 9 5】



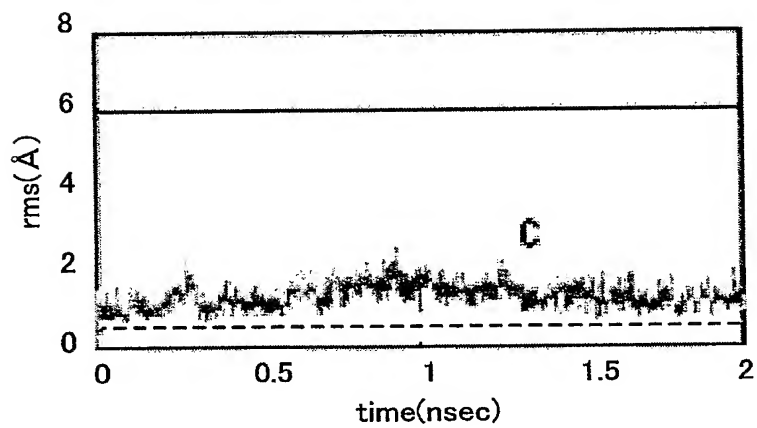
【図 9 6】



【図 97】

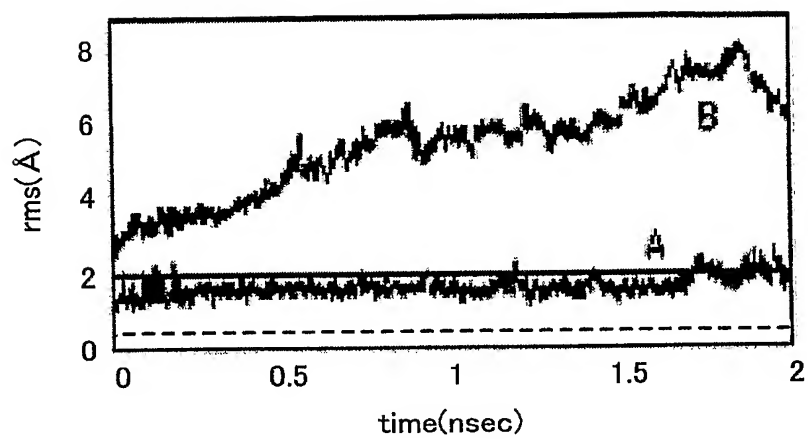


【図 98】

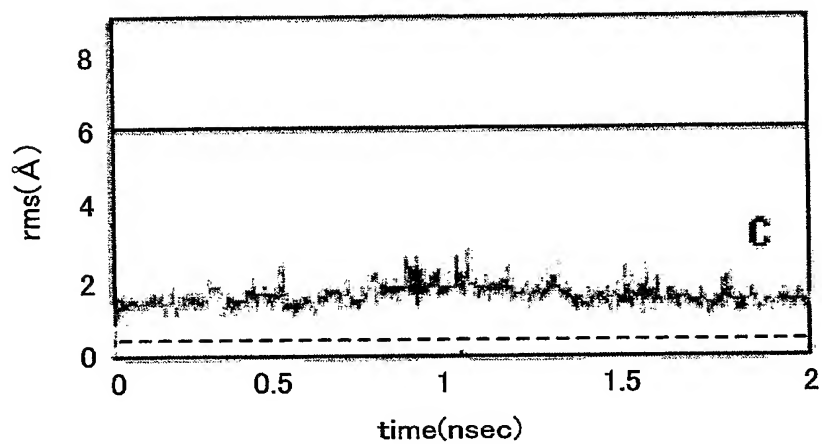




【図 99】

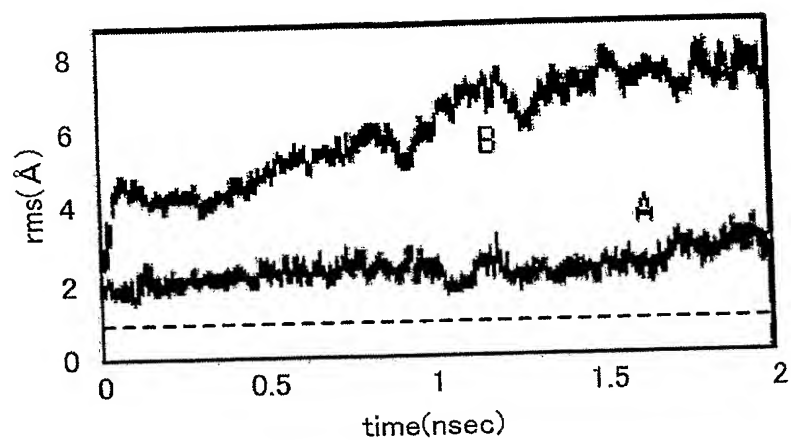


【図 100】

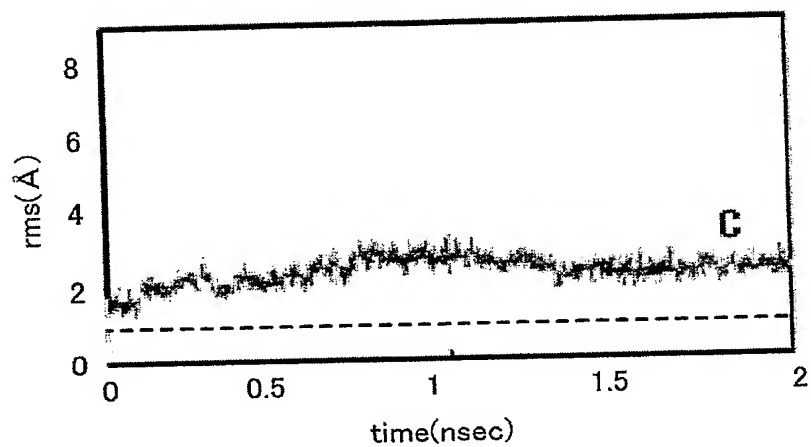




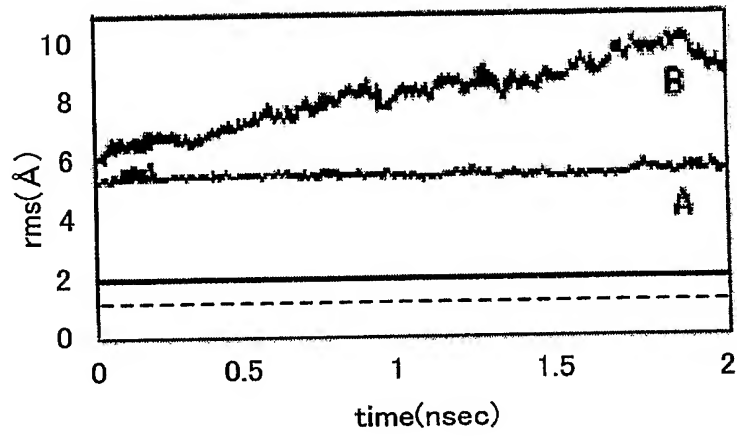
【図 101】



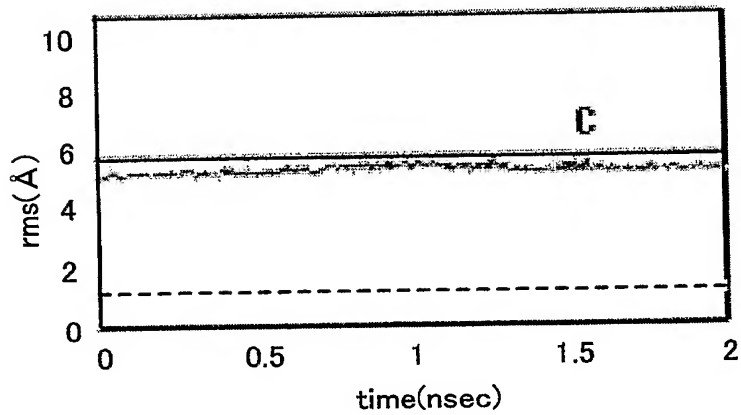
【図 102】



【図 103】

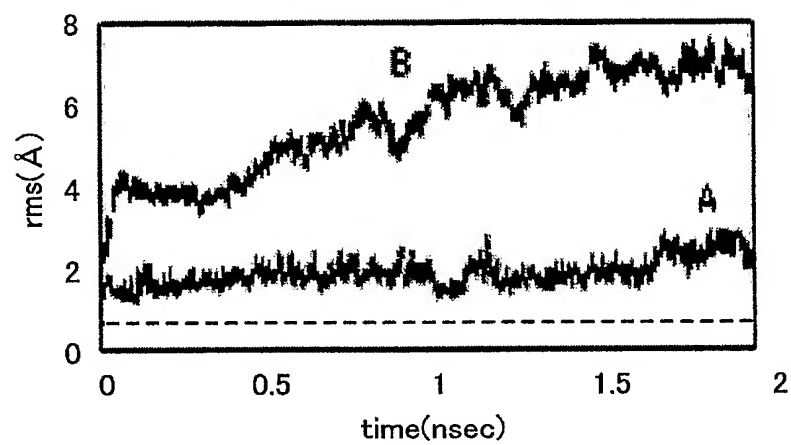


【図 104】

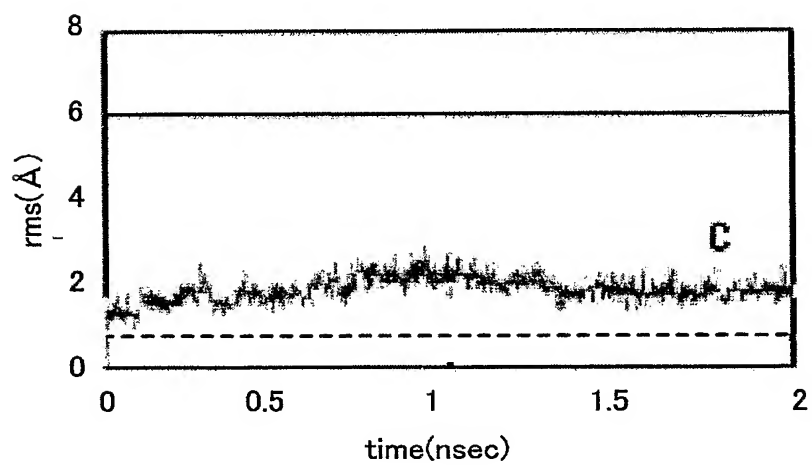




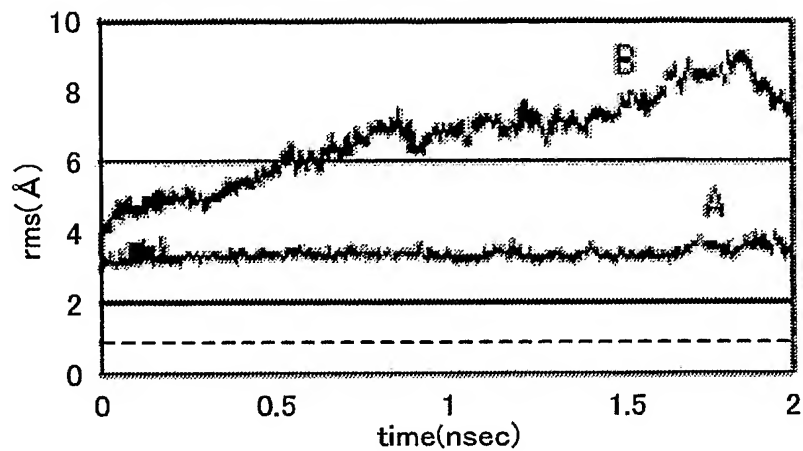
【図 105】



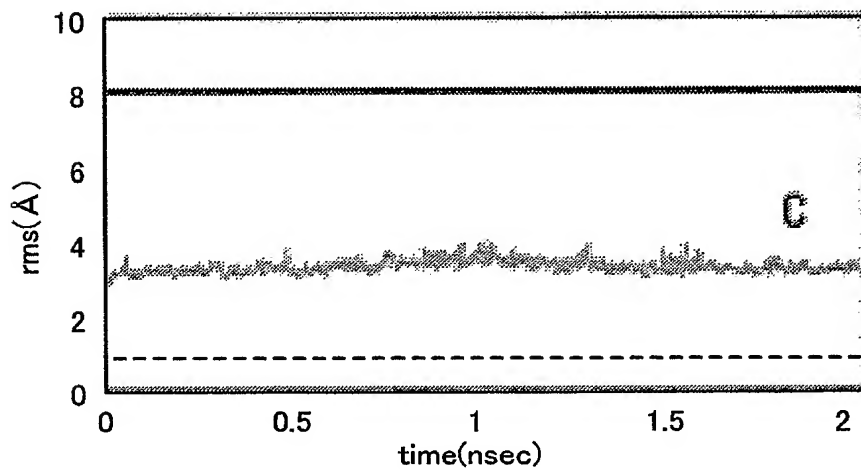
【図 106】



【図 107】

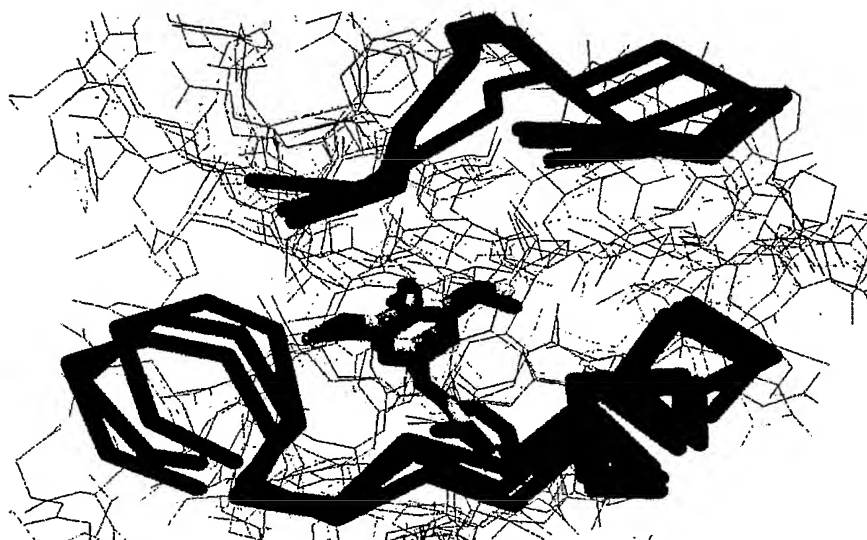


【図 108】

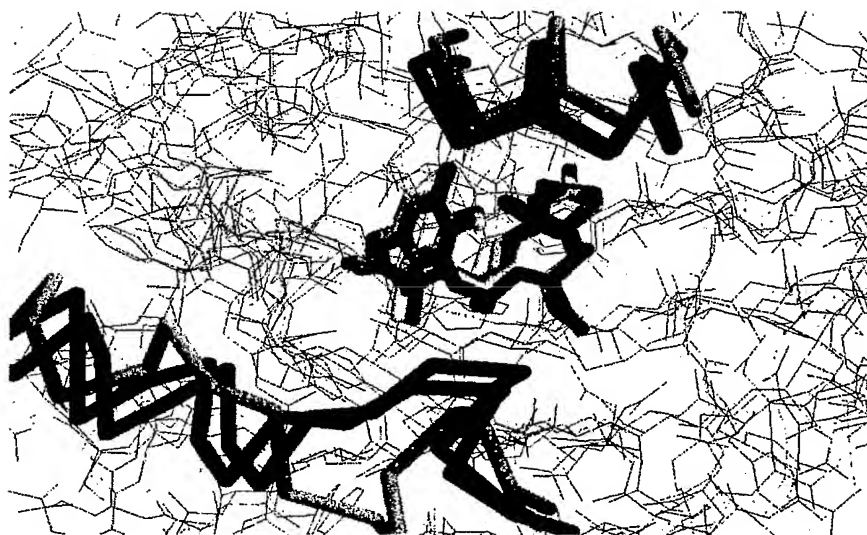




【図 109】

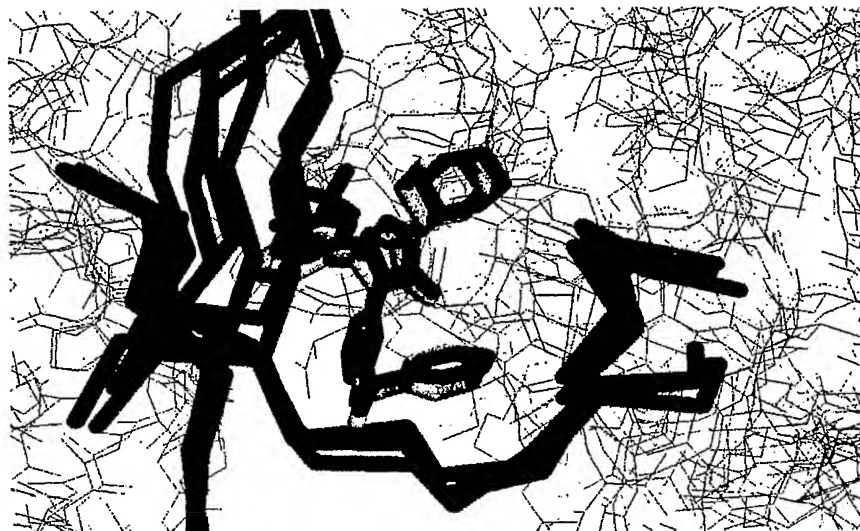


【図 110】





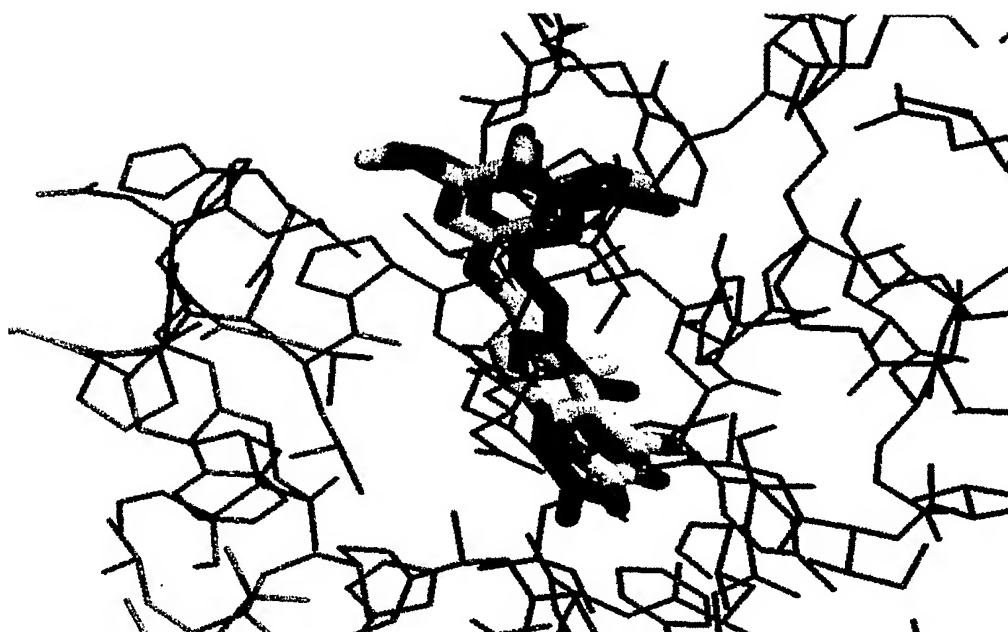
【図 1 1 1】



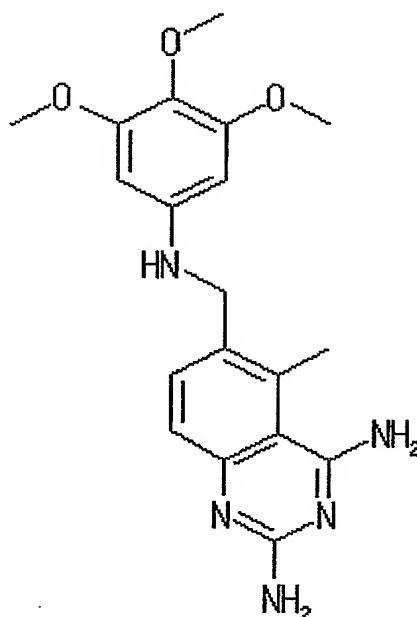
【図 1 1 2】

活性部位の原子	リガンドの原子タイプ	相互作用の強さ	相互作用の距離(Å)
LUE4 O	N.pl3	100	2.87
ASP26 OD1	N.ar	300	3.00
ASP26 OD2	N.pl3	300	3.00

【図 113】



【図 114】



## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 本発明は、誘導適合型受容体も含めた受容体／リガンド結合の解析を研究する方法の提供を目的としてなされたものである。

【解決手段】 本発明は、受容体の基準振動解析計算をまず行い、定常状態の受容体の主鎖二面角の揺らぎを計算する。そして、その揺らぎを基にした拘束を各原子にかけながら分子動力学計算を行うことでより精度の良い受容体の動的構造を予測する。また、本発明は、分子動力学計算より得た動的構造及び相互作用関数を用いることで、誘導適合型受容体にも応用できる受容体／リガンド結合を精度良く予測する。

【選択図】 図 1



特願 2 0 0 4 - 0 4 8 7 6 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 2 4 3 3 9 5 5 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]

2 0 0 3 年 1 1 月 2 7 日

名称変更

住所変更

住 所  
氏 名

東京都大田区東雪谷二丁目 1 5 番 9 号  
株式会社インシリコサイエンス